

MICROSCOPIA ELECTRONICA 92

**Trabajos presentados a la
XVI Bienal de la S.E.M.E.**

**Editores:
J. VILCHES - A. LOPEZ**

203
04
500

MICROSCOPIA ELECTRONICA 92

(TRABAJOS PRESENTADOS A LA
XVI BIENAL DE LA S.E.M.E.)



EDITORES:
J. VILCHES
A. LOPEZ





Depósito Legal: CA-633-92

I.S.B.N.: 84-7786-093-9

JIMENEZ-MENA, ARTES GRAFICAS, S.L.
Polígono Industrial Zona Franca.- Cádiz

PROLOGO

En los últimos años, ha tenido lugar un fuerte desarrollo de la Microscopía Electrónica en España a través de la adquisición de numerosos equipos y la creación de Servicios Centrales en las Universidades y Centros de Investigación; que han hecho posible una mayor presencia de nuestro país en las distintas actividades de la comunidad científica internacional. Dicha presencia debe ir avalada por la difusión de los conocimientos. En este sentido, éste volumen -que recoge los distintos trabajos que se presentaron en la XVI Reunión Bienal de la Sociedad Española de Microscopía Electrónica-, pretende mostrar un conjunto de publicaciones que revelan su estado actual en España. Como es lógico pueden faltar aportaciones de investigadores que, por una u otra razón, no acudieron a la Bienal; sin embargo creemos que el fin de ver recogido de modo amplio los trabajos que caracterizaron el encuentro mayoritario de científicos españoles contribuirá a un mayor conocimiento de nuestra labor.

El volumen se divide en dos grandes campos que a modo de áreas temáticas comprenden el mundo orgánico e inorgánico. Por otro lado, como cualquier publicación, éste volumen va precedido por un cúmulo de problemas que es necesario ir venciendo paulatinamente, empezando por las limitaciones económicas y por la propia existencia de factores -a veces no tangibles-, que obstaculizan la labor. Vencidos dichos problemas ve hoy la luz éste volumen en un momento próximo a la celebración del EUREM 92. Este hecho no solo es casual sino que servirá de presentación de la labor de la Microscopía Electrónica española.

Queremos dar las gracias a todos los que contribuyeron con su presencia al desarrollo de la Bienal, al Comité Científico Nacional, al Comité Organizador y a todos aquellos que con su labor anónima ayudaron a llevar a buen puerto ésta publicación y especialmente al Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz sin cuyo concurso no hubiese sido posible ésta edición.

Los editores

*J. Vilches Troya
A. López Muñoz*

INDICE

Ultraestructura de las células epiteliales de los ciegos pilóricos e intestino anterior de Salmo gairdneri, Rich.

M.A. Abaurrea; M.V. Ostos; M.I. Núñez.

1

Ultraestructura de la epidermis de *Phoronis hippocrepia* (Phoronida).

A. Aguirre; J. Benito; C.C. Emig; I. Fernández; F. Pardos; C. Roldán.

3

Aplicación de técnicas citoquímicas e inmunocitoquímicas para el conocimiento de la naturaleza de los nucleoloides en *Olea europaea*.

J.D. Alché; M.C. Fernández; M.I. Rodríguez-García.

5

Libro de Comunicaciones de la V Reunión de la Sociedad Española de Microscopía Electrónica. Cullera (Valencia) celebrada del 2 al 4 de Noviembre de 1972.

J. Alonso; J.J. Padrón; M.A. Castilla; J. Calap.

7

Características ultraestructurales del desarrollo de los ganglios espinales en el sapo corredor (Bufo calamita).

M.P. Alvarez; M.T. Solas; B. Fernández.

9

Estudio del plexo mientérico de la rata mediante microscopía electrónica de barrido.

M.P. Alvarez; M.T. Solas; B. Fernández.

11

Estudio ultraestructural preliminar del cerebelo de rata tratada con diacetilmorfina.

J.F. Aparicio; J.A. Casares; M.S. Poblador; C. Rojas; A. Raya; J.L. Lancho.

13

Ultraestructura de las células no linfoides del timo de Dicentrarchus labrax (L.)

M. Avilés-Trigueros; M.I. Villena; V. Navarro; J.A. Quesada.

15

Estudio comparado de la ultraestructura de los tentáculos de dos especies de Foronídeos (Lophophorata).

J. Benito; A. Aguirre; C.C. Emig; I. Fernández; F. Pardos; C. Roldán.

17

Estomatitis por amalgama conteniendo mercurio, estaño y plata. Estudio con microanálisis con rayos X (EMMA).

J. Calap; J.J. Padrón; M.A. Castilla; J. Vilches.

19

Aplicación del microanálisis de rayos X en la determinación de elementos inorgánicos

en la pared del polen.

B. Carretero; P.V. Crespo; M.I. Rodríguez-García.

21

Demostración de neumocitos incluidos en carcinomas pulmonares mediante estudio ultraestructural.

L. Carretero; E. Alvarez.

23

Estudio ultraestructural preliminar del músculo cardiaco de rata tratada con diacetilmorfina.

J.A. Casares; J.F. Aparicio; C. Rojas; M.S. Poblador; A. Raya; J.L. Lancho.

25

Localización ultraestructural de lisozima y glucoproteínas en la mucosa bronquial humana. Relación con los procesos de N- y O- glucosilación.

M.T. Castells; J.F. Madrid; J. Garrido; F. Hernández; J. Ballesta.

27

Caracterización histoquímica ultraestructural de residuos glucídicos en la mucosa laríngea humana.

M.T. Castells; J.F. Madrid; J.A. Martínez-Menárguez; J. Ballesta.

29

Comparación del test de Crump y Danks con una técnica original basada en estudio ultraestructural de los poros sudoríparos con SEM.

M.A. Castilla; J.J. Padrón; J. Calap; J. Peris.

31

Células sensoriales del órgano de la línea lateral de Gambusia affinis. Estudio ultraestructural preliminar.

R. Cernuda; M.A. del Brío; A. Coto; P. Riera; J.M. García.

33

Localización de glucoconjugados en espermatozoides de hamster en el epidídimo: estudio con lectinas.

N. Cortadellas; J. García-Valero.

35

Patrones microscópicos microvellositarios de la vellosidad intestinal.

P.V. Crespo; A. Campos.

37

Invasión por macrófagos del área de muerte celular en la vesícula del cristalino de embrión de pollo durante su desprendimiento del ectodermo: estudio a microscopía electrónica e inmunocitoquímica.

M.A. Cuadros; C. Martín; G. Martín-Partido; A. Rios; J. Navascués.	39
Ondas monoclonales en el mapeo antigénico de la infección natural por el virus de inmunodeficiencia humana.	
L. Cuevas; I. Santa María; M.I. Herrera; F. Sánchez-Alonso; R. Nájera.	41
Tipos de tanicitos en el hipotálamo medio del conejo (<i>Oryctolagus cuniculus</i>).	
M.A. del Brío; P. Riera; J.M. García; R. Cernuda; A. Coto.	43
Linfocitos intraepiteliales: posible origen de células dendríticas en aves.	
E. del Cacho; M. Gallego; M. Barberán; C. Arnal; J.A. Bascuas.	45
Transformación de células mioepiteliales en miofibroblastos.	
E. del Cacho; M. Gallego; M. Barberán; J.A. Bascuas	49
Elementos citoesqueléticos de la zona cortical de los oocitos maduros de moluscos polioplacóforos.	
M. Durfort; J. García-Valero.	53
Ultraestructura de las áreas pigmentadas ampulares de meriones unguiculatus.	
C. Escobar; F.P. García Ortega; A. Zuasti; C. Ferrer.	55
Variaciones ultraestructurales del polen durante el cultivo in vitro de anteras de <i>apsicum annuum</i> .	
B. Fadón; A. Olmedilla; M.C. Risueño.	57
Uso del 2-naftiltiol acetato (2-TNA) como sustrato para la demostración de la actividad enzimática esterasa no específica en linfocitos humanos. Estudio con microscopía electrónica de barrido.	
E. Fernández-Segura; J.M. García López; A. Gutierrez; A. Campos.	59
Ultraestructura de la piel de <i>Sparus auratus</i> (Teleosteo).	
C. Ferrer; A. Zuasti; M. García.	61
Diferencias estructurales del complejo rumino-reticular ovino al nacimiento y edad adulta mediante análisis por S.E.M.	
A. Franco; J.M. Vivo; S. Regodón; M.T. Guillén; E. Redondo.	63
Morfología microscópica del esófago de <i>Rana perezi</i> (Seoane, 1885)(Amphibia, Anura)	

en estado adulto.

J. Gallego-Huidobro; L.M. Pastor; A. Calvo.

65

Morfología microscópica de la mucosa de la unión esofagogástrica y del estómago de *Rana perezi* (Seoane, 1885)(Amphibia, Anura) en estado adulto.

J. Gallego-Huidobro; L.M. Pastor; A. Calvo.

67

Caracterización ultraestructural de las células GTH de *Sparus aurata*.

A. García Ayala; M.T. Lozano; J.A. Quesada; M. Villaplana; B. Agulleiro.

69

Caracterización ultraestructural de las células endocrinas del tracto digestivo de lubina (*Dicentrarchus labrax* L.) en las distintas etapas de desarrollo.

M.P. García Hernández; M.T. Elbal; B. Agulleiro.

71

Caracterización ultraestructural de las células endocrinas pancreáticas durante el desarrollo de la lubina (*Dicentrarchus labrax* L.)

M.P. García Hernández; M.T. Lozano; B. Agulleiro.

73

Observaciones ultraestructurales sobre el proceso de enquistamiento en cilios peritricos.

S. García; A. Guinea; A. Sola; S. Serrano.

75

Estudio ultraestructural del glomérulo renal en la filariosis canina.

J.C. Gómez-Villamandos; T. Moyano; J.L. Rodríguez; M.R. Morales-Lezcano;

J. Castellano.

77

Aspectos ultraestructurales funcionales del endotelio de los capilares del sistema nervioso central.

R. González; G. Martínez; M.V. Toledo; J. Martínez.

79

Nuevas aportaciones sobre las sinapsis comunicadas en el núcleo periacueductal del mesencéfalo.

R. González; G. Martínez; M.V. Toledo; J. Martínez.

81

Ultraestructura en MEB y actividades fosfatásicas en aparato digestivo de *Halobatrachus didactylus*.

M.L. González de Canales; M.C. Sarasquete; A. Grau; M. Rosety; F.J. Fernández Trujillo.

83

Myelinización en el nervio óptico de ratas criadas en condiciones de oscuridad absoluta.

P. González-Valverde; B. Mompeó; G. Sánchez; G. Salas; C. Pizarro. 85

Ultraestructura del oocito vitelogénico de Glossobalanus minutus (KOW).

C. Guillén; J. Benito. 87

Organización del citoesqueleto de la cavidad vestibular en Balantidium entozoon (Protozoa, Ciliophora).

A. Guinéa; A. Sola; S. Serrano. 89

Estudio con M.E.T. de los elementos peritubulares de los testículos criptorquídicos.

A. Gutierrez; F.J. Cañizares; A. Campos. 91

Nuevo método de detección antigénica por inmunoadherencia a *S. aureus* inmunomarcado y análisis por electrones retrodispersados.

M.I. Herrera; L. Cuevas; I. Santa María; C. Cantó; P. Pérez-Breña; D. Katz.

93

Técnica de preparación de muestras biológicas de gran tamaño (± 1 cm).

J. Lebrato; R. Ocete Rubio; A.M. Jiménez; P.M. Escolar; E. Gómez Asencio.

95

Respuesta del complejo lisosómico de las células del sinusoides hepático tras la administración de citrato férrico.

A. López; S. Vázquez; J. Vilches; C. Muñoz; L. Romero. 97

Respuesta del complejo lisosómico hepatocitario tras la administración de citrato férrico.

A. López; S. Vázquez; J. Vilches; L. de Palacio; J. Aparicio. 99

Estructura y función de los órganos de comunicación interzooidal en Briozoos Queilostomados (Bryozoa: Eurystomata).

C.M. López; J.C. García. 101

Efecto del nitrato sobre la ultraestructura de los peroxisomas y la localización de la atalasa en nódulos de Lupinus albus L. cv Multolupa.

C. Lorenzo; M.M. Lucas; A. Vivo; M.R. de Felipe.

103

Estudio inmunocitoquímico ultraestructural de los diferentes tipos de células endocrinas de los islotes de lubina (Dicentrarchus labrax).

M.T. Lozano; M.P. García Hernández; M.E. Abad; A. García Ayala; B. Agulleiro.

105

Distinción inmunológica de cepas de Bradyrhizobium sp. (Lupinus) por medio de M.E.

M.M. Lucas; A. Vivo; J.M. Pozuelo.

107

Localización ultraestructural de residuos GlcNac, GalNac, Man y Glc en las células principales y parietales de la mucosa fúndica humana.

J.F. Madrid; M.T. Castells; M. Avilés; F. Hernández; J. Ballesta.

109

Estudio ultraestructural de las secreciones glucoproteicas de las células superficiales y mucosas del cuello del estómago humano.

J.F. Madrid; M.T. Castells; J.V. Ortega; F. Hernández; J. Ballesta.

111

Adquisición directa de imágenes y tratamiento digital en microscopía electrónica de transmisión.

S. Marco; J.M. Carazo; G. Abella; J.L. Carrascosa.

113

Aplicación de la microscopía electrónica de barrido (SEM) al estudio del ciclo celular de ciliados: enquistamiento y división en Colpoda inflata.

A. Martín-González; L. Benítez; G. Palacios; J.C. Gutiérrez.

115

Análisis por microscopía electrónica de transmisión de formas criptobióticas teratológicas en el ciliado Colpoda inflata: un estudio comparativo.

A. Martín-González; G. Palacios; L. Benítez; J.C. Gutiérrez.

117

Secuencia del agrupamiento de las proteínas contráctiles para formar el esbozo de la sarcómera en los mioblastos del miotomo.

F.J. Martínez; M.V. Toledo; G. Martínez; R. González.

119

Centriolos, cuerpos basales y raicillas ciliares en el núcleo periacueductal del mesencéfalo.

G. Martínez; R. González; J. Martínez; M.V. Toledo.

121

Método de desulfatación para microscopía electrónica. J.A. Martínez-Menárguez; M. Avilés; M.T. Castells; M. García; J. Ballesta.	123
Influencia de la presencia de radicales sulfato en la unión de la lectina peanut agglutinin (PNA). J.A. Martínez-Menárguez; M. Avilés; J.F. Madrid; J. Ballesta.	125
Aislamiento y caracterización ultraestructural de las células sanguíneas de lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i> L.). J. Meseguer; M.A. Esteban; J. Muñoz; B. Agulleiro.	127
Ultraestructura del túbulo renal de la lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i> L.). J. Meseguer; A. García Ayala; M.A. Esteban; B. Agulleiro.	129
Caracterización ultraestructural de las células sanguíneas de dorada (<i>Sparus aurata</i> L.). J. Meseguer; A. López Ruiz; A. García Ayala; B. Agulleiro.	131
Ultraestructura de las células del exudado peritoneal de lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i> L.). J. Meseguer; J. Muñoz; M.A. Esteban; A. López Ruiz; B. Agulleiro.	133
Valoración de los distintos componentes nucleolares en células de plantas superiores. F.J. Moreno; R.M. Rodrigo; J. Torreblanca.	135
Separación celular en órganos linfoides de <i>Sparus aurata</i> (Teleosteo). Identificación ultraestructural de subpoblaciones de linfocitos con anticuerpos monoclonales. V. Navarro; J.H.W.M. Rombout; M.I. Villena; M.E. Abad; J.A. Quesada.	137
Parámetros ultraestructurales de la cáscara del huevo de ave. P. Nieto; L.J. Alberto.	139
Ultraestructura de la mucosa gástrica de <i>Salmo gairdneri</i> , Rich. M.V. Ostos; M.A. Abaurrea; M.I. Núñez.	141
Caracterización morfológica de la mucosa laríngea de rana perezi. L.M. Pastor; J. Gallego-Huidobro; A. Calvo.	143

Espectro de frecuencia de los diámetros de las fibras del nervio óptico de ratas criadas en oscuridad total.

C. Pizarro; B. Mompeó; G. Sánchez; B. Arias; P. González-Valverde. 145

Estudio microanalítico y ultraestructural del contenido lisosomal de las células digestivas del hepatopáncreas de moluscos bivalvos.

M. Poquet; J. Amor; M.G. Bozzo; J.R. Ferrer; J. García Valero; E. Ribes; E. Sagristá; M. Durfort. 147

Detección de cristales de mercurio a nivel tisular en la ostra (Crassostrea gigas).

M. Poquet; M.G. Bozzo; E. Sagristá; J. Amor; J. Ferrer; J. García Valero; E. Ribes; M. Durfort. 149

Cambios morfológicos en la superficie de explantes de próstata ventral de rata en cultivo de tejidos: Influencia de la prolactina.

L. Romero; C. Muñoz; A. López; J. Vilches. 151

Contribución de la microscopía electrónica de transmisión al diagnóstico de la Peste Equina Africana.

C. Rubio; A. Cubillo; H. Hooghuis; M.A. Marcotegui. 153

Estudio ultraestructural de la barrera hematotímica: células epitelioreticulares y macrófagos como responsables de la inmunocompetencia de los linfocitos T.

J. Ruiz; F. Marín; F. Ojeda; V. Puyet. 155

Expresión y distribución del receptor FcRIII (CD16) sobre la superficie de granulocitos humanos. Estudio con inmunomicroscopía electrónica de barrido.

E. Sánchez; E. Fernández-Segura; J.M. García; A. Campos. 157

Estudio comparado con MEB en la talasemia mayor y menor.

E. Sánchez; J.M. García; M.C. Sánchez-Quevedo; J.A. López; A. Campos. 159

Citología peritoneal en patología ginecológica (M. Optico y M. Scanning).

F. Sánchez; J. Botella; E. Aguilera; L.M. Gómez. 161

Primera aparición de miofilamentos gruesos en los mioblastos de embrión de pollo.

M.V. Toledo; F.J. Martínez; G. Martínez; R. González. 163

Vesículas de contenido electrodenso en los mioblastos del miotomo de embrión de pollo.

M.V. Toledo; F.J. Martínez; G. Martínez; R. González. 165

Trastorno ocupacional inducido por la inhalación de cobalto. Estudio del fluido de lavado broncoalveolar (BAL).

J.M. Tura; C. Xaus; A. Xaubet; A. Traveria; M.D. de Castellar; J. Sauló; C. Picado; C. Agustí. 167

Estimación de parámetros estereológicos en los simbiontes de dos líquenes pertenecientes a la familia Umbilicariaceae.

F. Valladares; C. Ascaso. 169

Estudio de los conectores vitrificados del bacteriófago T3 mediante criomicroscopía electrónica.

J.M. Valpuesta; H. Fujisawa; J.L. Carrascosa. 171

Evolución del citorretículo en el bazo de Dicentrarchus labrax (L.). Estudio ultraestructural.

M.I. Villena; M. Avilés-Trigueros; V. Navarro; J. Quesada; B. Agulleiro. 173

Localización ultraestructural del enzima alcoholdehidrogenasa en oocitos de Drosophila Melanogaster.

N. Visa; M.C. Santa-Cruz; J. Fibla; R. González-Duarte. 175

Applications os X-ray microanalysis in medicine.

A. Warley. 177

Estudio microanalítico de tejido pleural no patológico mediante SEM y EDXA.

C. Xaus; J.M. Tura; J. Ferrer; J. Lirola; R. Orriola; A. Traveria; J. Sauló. 185

Influencia de algunos elementos refractarios en la microestructura y fractura de aleaciones base níquel procesadas mediante solidificación rápida.

P. Adeva; J.L. González-Carrasco; J. Ibáñez; G. González-Doncel; M.C. Cristina; M. Aballe. 187

Aplicación de la microscopía electrónica de barrido al estudio de la distribución radial de inclusiones en un acero inoxidable tipo AISI-303, mediante digitalización y análisis

de imágenes.	
J.F. Almagro; M.A. Heredia.	189
Contraste anómalo en aleaciones Al-Si observado en el M.E.B.	
J.M. Badía; J. Ibañez.	191
Caracterización de materiales y dispositivos para detección de IR mediante técnicas de microscopía electrónica.	
P.A. Banda; J. Sangrador.	193
Determinación de la resolución espacial y de los factores k de Cliff-Lorimer en un microscopio Jeol-2000 FX.	
C. Barba; J.L. Baldonado; F. García-Alvarado.	195
Síntesis de un óxido no-estequiométrico de praseodimio. Estudio textural.	
S. Bernal; F.J. Botana; A. Jobacho; J.A. Pérez Omil.	197
Microanálisis de cerámicas romanas por microscopía electrónica.	
F. Bosch; M.T. Domenech; V. Peris; J.V. Gimeno.	199
Estudio por microscopía electrónica de estructuras SiO ₂ /Si implantadas con fósforo.	
S.A. Bota; J. Portillo; A. Cornet; J.R. Morante.	201
Caracterización de catalizadores Rh/TiO ₂ por microscopía electrónica de alta resolución.	
J.J. Calvino; M.A. Cauqui; G. Cifredo; R. García.	203
Utilidad de la microscopía electrónica de transmisión en la caracterización de catalizadores de cobalto promovidos por lantano.	
J.J. Calvino; G. Cifredo; J.M. Rodríguez-Izquierdo; H. Vidal.	205
Aplicación del SEM al análisis de fallos de componentes electrónicos.	
J.M. Cavero; Q. Pérez.	207
Use of XPS/ESCA and SEM to study the surface of chlorinated wool fibres treated via liposomes.	
M.D. de Castellar; J.M. Tura; A. de la Maza; F. García; J. Pujadas.	209
Study of reaction layers formed on molybdenum in a lubricant oil at different	

<i>temperatures by SEM, XPS and XRD.</i>	
M.D. de Castellar; J.M. Tura; A. Traveria; J. Pujadas; A. Montero.	211
<i>Preparación, microestructura y cristalización de aleaciones del sistema Nd-Fe-B obtenidas por solidificación rápida.</i>	
J.A. Diego; M.D. Baró; S. Suriñach; N. Clavaguera; M.T. Clavaguera-Mora.	213
<i>Tipos de microestructura observadas en aleaciones de Fe-Co-B-(Si,Nb) obtenidas por solidificación rápida.</i>	
J.A. Diego; S. Suriñach; M.D. Baró; N. Clavaguera; M.T. Clavaguera-Mora.	215
<i>Estudio analítico por microsonda electrónica de los pigmentos de la tabla del Juicio Final atribuida a Van der Stock.</i>	
M.T. Doménech; J.V. Gimeno; V. Peris; F. Bosch.	217
<i>Información y aplicaciones de las imágenes de la M.E. de Barrido con electrones retrodispersados (ER).</i>	
R. Fontarnau; C. Carulla; R. Bargallo.	219
<i>Estudio por microscopía electrónica de alta resolución de Ba₂NdFe₃O_{8.40}.</i>	
E. García; M. Parras; M.J. Sayagués; M. Vallet; J.M. González Calbet.	221
<i>Microanálisis SEM-EDS de inclusiones fluidas en Halita.</i>	
J. García Veigas; C. Ayora; J.J. Pueyo; R. Fontarnau.	223
<i>Examen analítico por microsonda electrónica de pigmentos de la decoración mural de interiores del Palacio del Marqués de Dos Aguas (Valencia).</i>	
J.V. Gimeno; M.T. Doménech; V. Peris; F. Bosch.	225
<i>Desgaste por abrasión de bolas de alumina: relación con su microestructura.</i>	
A. Gozalbo; M.J. Orts; M. Picó.	227
<i>Aparición de núcleos de martensita γ inducida por tensión en un monocristal BCu-20.85Zn-6.15Al con memoria de forma.</i>	
J.M. Guilemany; F.J. Gil.	229

- Coexistencia de martensita α' y B' en aleaciones Cu-Zn-Al con memoria de forma.*
J.M. Guilemany; F.J. Gil. 231
- Estudio en TEM del proceso dinámico de formación de precipitados α y γ en una aleación Cu-Zn-Al-Co.*
J.M. Guilemany; J. Fernández; F. Peregrín; J.R. Miguel. 233
- Morfologías al SEM y microanálisis EDS de recubrimientos sobre aleaciones ligeras de carburo de wolframio-titanio obtenidas por técnicas de hipervelocidad.*
J.M. Guilemany; N. Llorca; J. García; M.D. Núñez. 235
- Estudio mediante experimentos in situ en TEM de la formación de precipitados en aleaciones con memoria de forma Cu-Al-Mn.*
J.M. Guilemany; F. Peregrín; J. Fernández; J.R. Miguel. 237
- Caracterización mediante SEM(BSE)-EDS de escorias procedentes de la eliminación de níquel en cobre afinado térmicamente.*
J.M. Guilemany; F. Peregrín; O. Guixá; P. Rifá. 239
- Caracterización y modificaciones estructurales en polvos de carbonitruro de titanio en el proceso de obtención de Cermets identificados mediante técnicas de SEM-EDS y de análisis de imagen.*
J.M. Guilemany; I. Sanchiz; N. Llorca; J.R. Miguel; M. Albajar; F. Fernández; E. Schomolling. 241
- Estructuras al SEM de nuevas aleaciones tenaces de metal duro reveladas con reactivos de ataque profundo.*
J.M. Guilemany; I. Sanchiz; N. Llorca; J.R. Miguel; M. Albajar; F. Fernández; E. Schomolling. 243
- El microscopio electrónico de barrido como instrumento de estudio del biodeterioro de obras de arte.*
M. Hernández; J.J. Ortega; C. Sáiz. 245
- Preparación de muestras para el control de fabricación en microelectrónica.*
S. Hidalgo; A. Fauquet. 247
- Morfología de las grietas y análisis fractográfico de la aleación Ti-6Al-4V a fatiga oligocíclica.*

M. Marsal; F.J. Gil; J.A. Planell. 249

Utilización de los electrones retrodispersados para la caracterización textural de las rocas.

B. Menéndez; M. Montoto; C. de Llanos. 251

Estudio mediante microscopía electrónica de alta resolución (HRTEM) de un sistema heteroepitaxial con un alto desajuste.

S.I. Molina; G. Aragón; R. García. 253

Métodos de contraste de voltaje cualitativos con haz continuo.

E. Montero; I. Rebollo; R. García. 255

Microestructuras presentes en el aluminio de muy alta pureza (6N y 5N) deformado por fluencia.

M.L. Nó; C. Esnouf; J. San Juan. 257

Determinación estructural del BaFeO_{2.50} por HREM y CIP.

M. Parras; X. Zou; S. Hovmoller; M. Vallet-Regí; J.C. Grenier; J.M. González-Calbet. 259

Preparación de heteroestructuras semiconductoras, por sección transversal, para la observación en TEM.

F. Peiró; J. Portillo; A. Cornet; J.R. Morante. 261

Estudio de la influencia de la preparación de sustrato sobre la calidad de capas crecidas por epitaxia de haces moleculares.

F. Peiró; J. Portillo; A. Herms; A. Cornet; J.R. Morante. 263

Estudio de interfaces en heteroestructuras de InAlAs y InGaAs sobre InP preparadas por cleavage.

F. Peiró; A. Vilá; A. Cornet; J.R. Morante. 265

Estudio mediante microscopía electrónica de transmisión de capas enterradas de SiO₂ obtenidas por implantación iónica de oxígeno.

A. Pérez Rodríguez; A. Vilá; A. Cornet; J.R. Morante. 267

Caracterización por MEB y EDRX de eflorescencias salinas en diferentes monumentos.

J.L. Pérez; A. Justo; C. Maqueda; E. Gómez. 269

- Análisis de defectos por TEM en capas de GaAs crecidas sobre Si.*
J. Portillo; A. Cornet; P. Peiró; A. Herms; J.R. Morante; Y. González; L. González; F. Briones. 271
- Microestructura y microanálisis por SEM/EDX y STEM/EDX de granates uvarovita.*
J.M. Rincón; J. Alarcón; M.A. Tena; J. Carda. 273
- Determinación experimental de las constantes de Cliff-Lorimer para el análisis por STEM/EDX de granates de cromo de uvarovita.*
J.M. Rincón; J. Carda; G. Monrós; J. Alarcón. 275
- Materiales rocosos observados mediante microscopía acústica. Comparación con la microscopía electrónica de barrido.*
A. Rodríguez; G.A.D. Briggs; M. Montoto. 277
- Aplicaciones de la microscopía electrónica de barrido en el estudio del clinker de cemento Portland.*
A. Rodríguez; M. Montoto; C de Llanos; B. Menéndez. 279
- Estudio mediante microscopía electrónica de transmisión de estructuras lópos para tecnología CMOS submicra.*
A. Romano-Rodríguez; H. Norström; J. Vanhellemont. 281
- Técnicas de preparación de muestras de materiales semiconductores para su observación en el microscopio electrónico de transmisión.*
A. Romano-Rodríguez; J. Vanhellemont; H. Bender; J.R. Morante. 283
- Restauración de imágenes desenfocadas en un T.M.E. mediante proyecciones sobre conjuntos convexos y cerrados.*
J.R. Sanjurjo; E.L. Zapata; J.L. Carrascosa; J.M. Carazo. 285
- Study of silver-bearing filler metal diffusion in copper metal base by SEM and EDXA, in the brazing.*
A. Travería; J.M. Tura; X. Camps; M.D. de Castellar; J. Sauló. 287
- Aerosol contamination of glass insulators in high tension network lines.*
A. Travería; J.M. Tura; M.D. de Castellar; C. Xaus; R. Coy; J.F. García; A. Montero. 289

Identificación de defectos del algodón ("Honey Dew") por SEM, IR y cromatografía en capa fina.

J.M. Tura; M.D. de Castellar; A.M. Manich; A. Travería; M. Font-Altaba; J. Pujadas; F. Marsal; J. Isart. 291

Estudio de dominios magnéticos en cintas amorfas de Fe₇₈B₁₃Si₉ por microscopía electroacústica de barrido.

M. Urchulategui; J. Piqueras; C. Aroca. 293

Estudio de depósitos de contaminantes ambientales en superficies de rocas monumentales mediante S.E.M. y E.D.A.X.

M. Vázquez; R.M. Esbert; F.J. Alonso. 295

Estudio por microscopía electrónica de GaAs dopado con Sn mediante irradiación con laser pulsante de rubí.

A. Vilá; A. Herms; A. Cornet; J.R. Morante; B. García-Carretero; J. Piqueras. 297

Cambios en la microestructura de los suelos producidos como consecuencia de la extracción de metales Unidos por radicales orgánicos y materia orgánica.

J. Wierzechos; C. Ascaso; M.T. García González. 299

Composition particle-size relationship in atmospheric aerosol samples.

C. Xaus; J.M. Tura; A. Travería; E. Casassas; F. García. 301

CAMPO ORGANICO

Título: Ultraestructura de las células epiteliales de los ciegos pilóricos e intestino anterior de Salmo gairdneri, Rich.

Autor(es): M.A. Abaurrea Equisoain; M.V. Ostos Garrido; M.I. Núñez Torres.

Departamento: Biología Celular.

Centro: Facultad de Ciencias. Universidad de Granada.

Introducción: La finalidad del presente trabajo es determinar las características ultraestructurales de las células epiteliales que limitan el segmento intestinal anterior, provisto de ciegos pilóricos, analizando la distribución intracelular y extracelular de las partículas lipídicas en trucha sometidas a una dieta constituida básicamente por proteínas, hidratos de carbono y grasas procedentes de harina de pescado azul, para contribuir a clarificar el papel jugado por este segmento postgástrico en las funciones digestivas absorbentes.

En estudios realizados sobre el tracto digestivo de teleósteos la porción anterior o proximal aparece especializada en la absorción de grasa de la dieta (Noaillac-Depeyre y Gas, 1974). Los ciegos pilóricos, con estructura histológica análoga a la del intestino anterior, comportan un aumento de la superficie intestinal.

Material y Métodos:

Para la realización del presente trabajo utilizamos ejemplares jóvenes de trucha arco iris, que se mantuvieron en cubas de vidrio alimentadas con una dieta que contiene un 45 % de proteínas, un 20 % de hidratos de carbono y un 12 % de grasa. Previa anestesia con MS 222 Sandoz y tras decapitación se extraen las porciones intestinales objeto de estudio que son fragmentadas en porciones de un milímetro, fijadas en glutaraldehído al 4 % en tampón cacodilato y postfijadas con $0,04$ al 1,5 % en el mismo tampón. Tras deshidratación en acetonas de concentración creciente se incluyeron en Epon 812. Los cortes ultrafinos se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo.

La lámina epitelial en la porción anterior del intestino aparece
Resultados y Discusión: constituida mayoritariamente por dos tipos celulares: células absorbentes o enterocitos y células caliciformes o mucosecretoras. Los enterocitos muestran rasgos ultraestructurales que los relacionan con procesos de absorción. En su extremo apical presentan abundantes microvellosidades entre las que se observan gotitas lipídicas alineadas. En el citoplasma subyacente el retículo forma una extensa red constituida por túbulos y vesículas que albergan pequeñas partículas lipídicas semejantes a las descritas como VLDL (Stroband y Debets, 1978). En peces con una dieta natural la hidrólisis intraluminal de los triglicéridos es completa por acción de la lipasa pancreática (Noaillac-Depeyre y Gas, 1974). Los productos resultantes combinados con la bilis, forman diminutas micelas y de este modo los ácidos grasos y monoglicéridos difunden a través de la membrana plasmática apical siendo resintetizados en triglicéridos a nivel de la red apical del retículo. Las partículas lipídicas se visualizan además en el aparato de Golgi. El retículo endoplasmático rugoso tiene una orientación longitudinal

preferente. El citoplasma en sus regiones paranuclear e infranuclear presenta estructuras lamelares con luz estrecha y de extremo ciego, que parecen jugar un papel importante en el transporte de las partículas lipídicas desde posiciones intracelulares hacia los espacios intercelulares laterales y basales. Efectivamente exhiben una serie de dilataciones que aparecen llenas de material denso a los electrones finamente particulado, siendo frecuentes las comunicaciones entre la luz de las estructuras lamelares y las dilataciones de los espacios intercelulares. En la porción basal, y asociadas con las invaginaciones que constituyen las estructuras lamelares, se observan abundantes mitocondrias por lo que algunos autores las relacionan con transporte de agua y nutrientes (Yamamoto, 1966). Las partículas lipídicas encontradas y descritas representan la forma de transporte de la grasa alimentaria y juegan el mismo papel que los quilomicrones de mamífero (Bergot y Fléchon, 1970). Figs. 1 y 2.

Las células mucosecretoras, que muestran mucosustancias neutras y ácidas, aparecen dispersas en la lámina epitelial entre los enterocitos. Los gránulos mucosos ocupan la mayor parte del citoplasma, que en la porción basal aparece ocupado por un importante sistema sacular de retículo endoplasmático rugoso. El aparato de Golgi muestra gránulos más o menos voluminosos según el grado de maduración de la célula. Fig. 3.

- Bergot, P. y Fléchon, J.F., 1970. "Forme et voie d'absorption intestinale des Bibliografía: acides gras a chaîne longue chez la Truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*, - Rich). I. Lipides en particules". *Ann.Biol.Anim.Biochim Biophys.* 10:459-472.
- Noaillac-Depeyre, J. 1974. "Fat absorption by the enterocytes of the carp (*Cyprinus carpio*, L.)". *Cell Tiss. Res.*, 155:353-365
- Stroband, H.W.J. y Debets, F.M.H., 1978 "The ultrastructure and renewal of the intestinal epithelium of the juvenile grasscarp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). *Cell and Tiss. Res.*, 187:181-200.
- Yamamoto, I. 1966 "An electron microscope study of the columnar epithelial cell in the intestine of fresh water teleosts: goldfish (*Carassius auratus*) and rainbow trout (*Salmo iridens*). *Z. Zellforsch.*, 72:66-87.

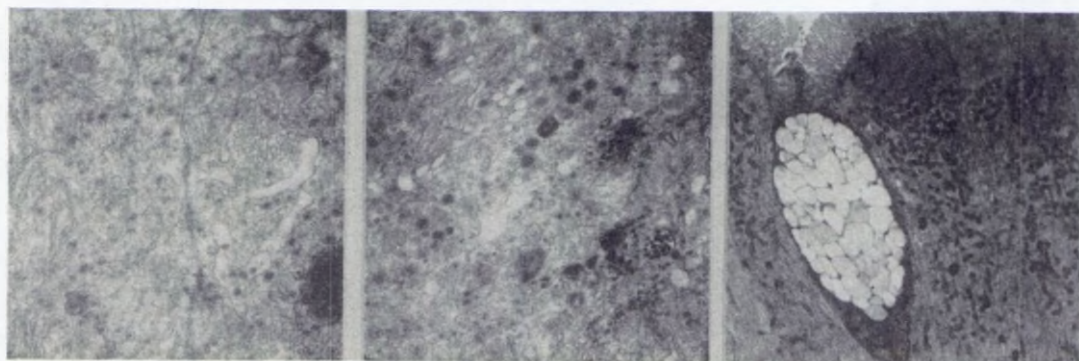


Figura 1

Figura 2

Figura 3

Ultraestructura de la epidermis de *Phoronis hippocrepia* (Phoronida)

Aguirre A., Benito J., Emig C. C., Fernández I., Pardos F. y Roldán C.

Departamento de Biología Animal I, Facultad de Biología, Universidad Complutense, 28040 Madrid

Introducción:

Phoronis hippocrepia vive en un tubo segregado por la epidermis, que perfora rocas y conchas vacías o se crusta en sustratos duros. Esta epidermis es variable en altura, siendo más alta en el tronco y más baja en la pólpa y en los tentáculos, y consiste en una simple capa celular con un ribete en cepillo de microvellosidades que descansa sobre una membrana basal. Entre las bases de las células epidérmicas se observa un patente plexo nervioso cuyas fibras contienen vesículas claras y densas a los electrones.

En este trabajo, los seis tipos celulares, que constituyen la epidermis de *P. hippocrepia*, han sido estudiados del punto de vista ultraestructural, así como su distribución al largo de la pared del tronco comparándola con estudios previos en otros Foronideos (Selys-Longchamps, 1907; Pourreau, 1979; Emig, 1982; Fernández *et al.*, en prensa).

Materiales y Métodos:

Se han utilizado individuos adultos de *Phoronis hippocrepia* recogidos en la costa próxima a Marsella a una profundidad de 10 m. Se fijaron en glutaraldehído al 4% en agua de mar filtrada y postfijados en OsO_4 al 1% en agua de mar filtrada. Posteriormente fueron deshidratados e incluidos en Araldita por el método habitual. Las secciones fueron realizadas con un ultramicrotomo LKB III, posteriormente teñidas con citrato de plomo y observadas y fotografiadas en un Philips EM201.

Resultados y Discusión:

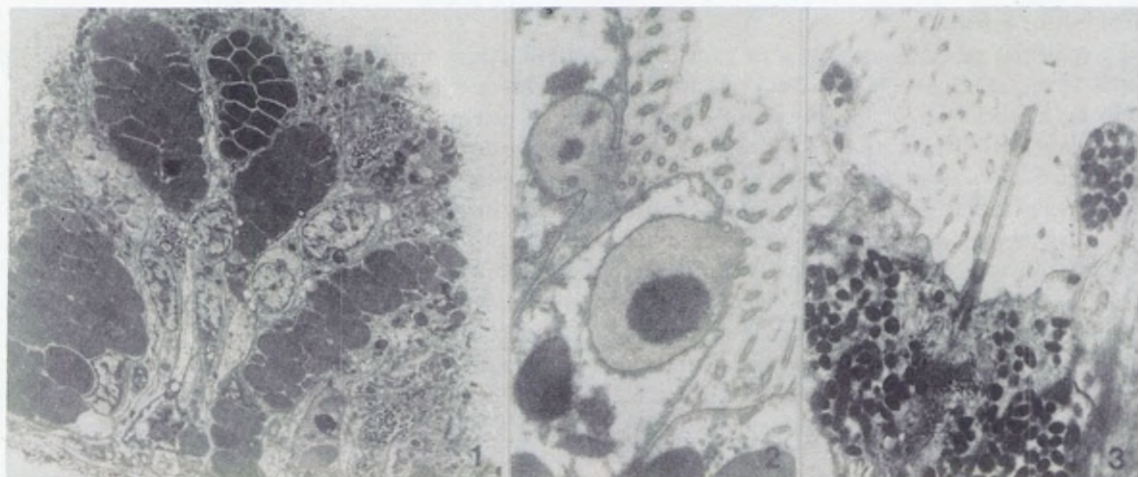
La epidermis de *P. hippocrepia* es un epitelio monoestratificado compuesto por células de soporte entre las cuales se intercalan células "adhesivas" y cuatro tipos diferentes de células glandulares (Fig. 1). Las **células de soporte**, monociliadas, están provistas de microvellosidades cubiertas por un glicocalix de aspecto fibrilar. En el citoplasma, especialmente en la parte apical, existen gránulos de contenido homogéneo y electrondenso (Fig. 2); previo a la exocitosis, su contenido se hace fibrilar y menos electrondenso (Fig. 2); el material liberado forma la capa del glicocalix que protege la epidermis contra la abrasión mecánica de acuerdo con Pardos *et al.* (1991) y Fernández *et al.* (en prensa). Estrechamente relacionado con los gránulos existe un aparato de Golgi bien desarrollado, así como cisternas de RER y ribosomas libres. Paquetes de tonofilamentos recorren longitudinalmente la célula y actúan como citoesqueleto para mantener su forma y propiedades estructurales. Las **células "adhesivas"** son monociliadas y están provistas de numerosos gránulos ovalados de pequeño tamaño (0.3-0.1 μm). Presentan procesos digitiformes característicos, que se extienden dentro de la capa de microvellosidades (Fig. 3). Estas células son algo más abundantes en la región posterior del tronco. Presentan características ultraestructurales semejantes a las descritas en Turbellarios y algunos Arquinelidos (Tyler, 1976;

Martin, 1978) y de acuerdo con estos autores sugerimos una función de anclaje para este tipo celular, que ya fue mencionada en *Phoronis psammophila* por Fernández *et al.* (en prensa).

De las **células glandulares** (Fig. 1), que presentan un poro rodeado de microvellosidades muy cortas y núcleo basal, se diferencian 4 tipos, uno con secreción de mucopolisacáridos ácidos y tres con secreción muco-proteínica: **a) células mucosas:** con gránulos de tamaño medio ($0.8\ \mu\text{m}$) de forma esférica o poligonal, que proceden del aparato de Golgi bien desarrollado. El contenido de estos gránulos es homogéneo y su densidad electrónica clara o moderada. Estas células son abundantes en la región media y posterior del tronco. **b) células NAM 1:** los gránulos de secreción son de tamaño grande ($2\ \mu\text{m}$) y suelen tener forma poligonal como consecuencia de la presión existente entre ellos. Por lo general presentan una o más condensaciones electrondensas en una matriz de moderada densidad electrónica y subestructura fibrilar. El aparato de Golgi está poco desarrollado. Las NAM 1 están presentes en la región anterior del tronco. **c) células NAM 2:** con característicos gránulos ovalados ($1.5\text{-}2\ \mu\text{m}$) y contenido homogéneo de moderada densidad electrónica. Los gránulos inmaduros muestran, sin embargo, un contenido filamentosos y claro a los electrones. El RER está ampliamente desarrollado. Se localizan en la región posterior del tronco donde son muy abundantes y en la ampolla. **d) células NAM 3:** caracterizadas por contener gránulos de secreción muy osmiófilos, de tamaño y forma variables que llegan a ocupar toda la célula. Con frecuencia los gránulos se fusionan y pueden llegar a formar una masa única que se libera por un mecanismo apocrino. Son más abundantes en la región media y posterior del tronco así como en la ampolla. La secreción de estos cuatro tipos de células glandulares intervienen en la formación y mantenimiento del tubo (Pourreau, 1979; Emig, 1982; Fernández *et al.*, en prensa) y probablemente en la perforación del sustrato duro.

Bibliografía:

- Emig, C. C. 1982. The biology of Phoronida. *Adv. mar. Biol.* 19: 1-89. Fernández I., Aguirre A., Pardos F., Roldán C., Benito J. and Emig C. C. (en prensa). The epidermis of *Phoronis psammophila* Cori (Phoronida, Lophophorata): an ultrastructural and histochemical study. *Can. J. Zool.* Martin, G. G. 1978. The duo-gland adhesive system of the Archiannelids *Protodrilus* and *Saccocirrus* and the Turbellarian *Monocelis*. *Zoomorphology* 91: 63-75. Pardos, F., Roldán, C., Benito, J., and Emig, C. C. 1991. Fine structure of the tentacles of *Phoronis australis* Haswell (Phoronida, Lophophorata). *Acta Zool.* 72 (2): en prensa. Pourreau, C. 1979. Morphology, distribution and role of the epidermal gland cells in *Phoronis psammophila* Cori. *Téthys* 9: 133-136. Selys-Longchamps, M. de 1907. *Phoronis*. *Fauna Flora Golf Neapel*, 1-280. Tyler, S. 1976. Comparative ultrastructure of adhesive systems in the Turbellaria. *Zoomorphology* 83: 1-76.



APLICACION DE TECNICAS CITOQUIMICAS E INMUNOCITOQUIMICAS PARA EL CONOCIMIENTO DE LA NATURALEZA DE LOS NUCLEOLOIDES EN *Olea europaea*

J.D. Alché, M.C. Fernández y M.I. Rodríguez-García

Citología Vegetal. Estación Experimental del Zaidín (CSIC). Prof. Albareda,
1. 18008 GRANADA

Introducción:

Se conoce como "nucleoloides" a cuerpos citoplásmicos de características morfológicas análogas a las del núcleo, descritos por primera vez bajo este nombre por Dickinson y Heslop-Harrison (1970). Sin embargo, previamente ya se habían hecho otras referencias a este tipo de cuerpos cuya presencia parece ser frecuente durante la microsporogénesis en plantas. En microsporocitos de *Olea europaea* también se han encontrado durante la 2ª división meiótica, (Rodríguez-García y Fernández, 1987).

En este estudio se exponen los resultados de la aplicación de diversas técnicas citoquímicas e inmunocitoquímicas con objeto de conocer los componentes específicos de estos cuerpos semejantes al nucleolo.

Material y Métodos:

Anteras jóvenes de olivo *Olea europaea* fueron fijadas en glutaraldehído al 3% y posteriormente incluidas parte en Epon y parte en Lowicryl K4M.

Se utilizaron siguientes citoquímicas a nivel de microscopía óptica y electrónica:

- Tinción de azure B, específica para materiales ácidos.
- Método de naranja de acridina al microscopio de fluorescencia para ácidos nucleicos.
- Método de EDTA de Bernhard (1969), tinción preferencial de ribonucleoproteínas.
- Tinción argéntica del NOR (Moreno et al., 1985)
- Tinción de oxinitrato de Bismuto (Locke & Huie 1977) para proteínas altamente fosforiladas.

Inmunocitoquímica para detectar DNA, utilizando un doble inmunomarcado mediante anticuerpos monoclonales anti-DNA.

Resultados y Discusión:

La naturaleza ribonucleoproteica de los nucleoloides ha quedado demostrada dada su positividad tanto a la tinción azure B, la cual tiñe específicamente materiales ácidos, como con su fluorescencia con naranja de acridina, método para ácidos nucleicos. En ambos casos nucleolo y nucleoloides muestran similar comportamiento con las reacciones mencionadas. Igual ocurre con la técnica de EDTA (Bernhard, 1969), tinción preferencial de ribonucleoproteínas a nivel ultraestructural. Nucleolos, nucleoloides y región intercromatínica aparecen intensamente teñidas en relación con la decoloración que presenta la cromatina condensada (Fig. 1)

La presencia de otros compuestos de naturaleza diferente a RNA ha sido testada usando técnicas citoquímicas e inmunocitoquímicas. La presencia de proteínas argirófilas fueron detectadas mediante tinción de plata (Moreno et al., 1985). Se encontró precipitado en el componente fibrilar del nucleolo, el cual en estos estadios está constituido exclusivamente por el componente fibrilar, así como en los "nucleoloides", los cuales aparentemente también están constituidos por este componente fibrilar (Fig. 2). Proteínas altamente fosforiladas fueron localizadas a nivel ultraestructural mediante la técnica de oxinitrato de bismuto (Locke y Huie

1977). Depósitos de bismuto presentan un grano extremadamente fino y se encontraron en el nucleolo, la región intercromatínica y en los nucleoloides (Fig. 3). Las proteínas argirofílicas y altamente fosforiladas han sido descritas en el nucleolo de muchas especies y se les ha propuesto un papel en la transcripción y/o procesamiento de RNA ribosomal.

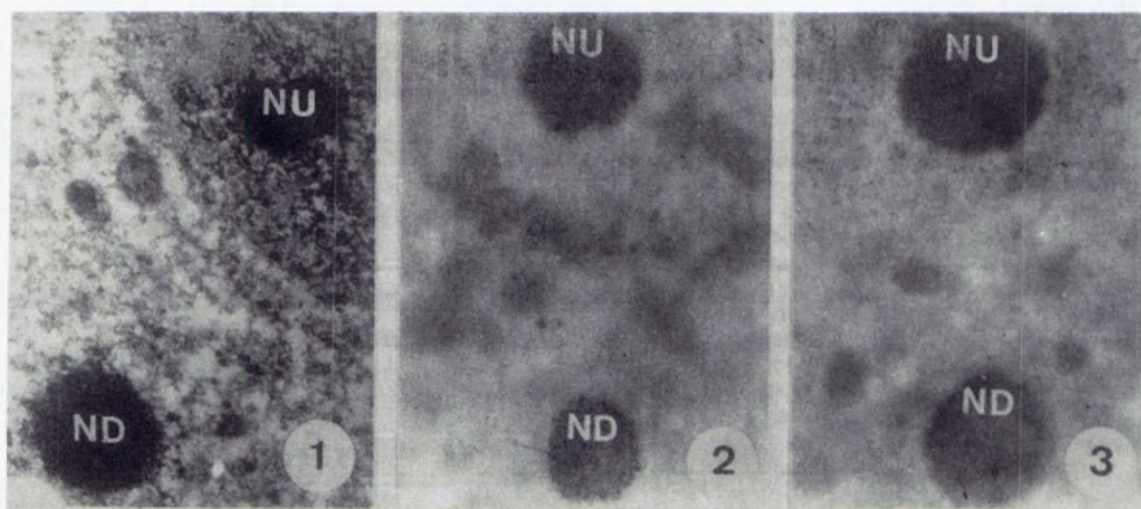
El DNA no fue detectado en los nucleoloides mediante inmunocitoquímica, utilizando un suero monoclonal anti-DNA. El inmunomarcado se deposita en áreas de una alta concentración de DNA, así como en determinadas regiones de ciertas organelas. El uso de todas estas técnicas muestran una composición similar del nucleolo y nucleoloides con respecto a sus componentes más significativos: DNA, RNA y proteínas. Esta marcada similitud tanto en composición química como ultraestructural indican la posibilidad de una significación fisiológica análoga para ambas estructuras en relación con la restauración de la población ribosómica de acuerdo con la hipótesis de Dickinson y Heslop-Harrison, (1970)

Este trabajo ha sido subvencionado gracias al Proyecto de la DGICYT PB87-0332-C02-02

Bibliografía:

- BERNHARD, W. (1969). J. Ultrastruct. Res. 27, 250-265.
DICKINSON, H.G., HESLOP-HARRISON, J. (1970). Protoplasma 69, 187-200
LOCKE, M., HUIE, P. (1977). Tissue cell. 9,347-371
MORENO, F.J., HERNANDEZ-VERDUN, D., MASSON, C., BOUTEILLE, M. (1985). The J. of Histochem. and Cytochem. 33, 389-399.
RODRIGUEZ-GARCIA, M.I., FERNANDEZ, M.C. (1987). Biology of the Cell. 60, 155-160.

NU = Nucleolo ND = Nucleoloide



Libro de Comunicaciones de la V Reunión de la Sociedad Española de Microscopía Electrónica. Cullera (Valencia) celebrada del 2 al 4 de Noviembre de 1972.

ALONSO, J.; PADRON, J.J.; CASTILLA, M.A.; CALAP, J.

Medicina (Dermatología)

Facultad de Medicina. Universidad de Cádiz.

Introducción:

En 1972, se celebró en Valencia una Reunión de la SEME, editándose en el año siguiente un Libro con las Comunicaciones que se presentaron en dicha reunión. Dicho libro consta de 247 páginas con un índice de 62 autores, 144 figuras (39 láminas).

Los trabajos se dividieron en dos grupos:

Los del Campo Inorgánico(11) y los del Campo Orgánico (35).

De los 62 autores firmantes de dichos trabajos, 16 correspondieron al Campo Inorgánico y 46 al Campo Orgánico.

Participaron 3 Instituciones del Campo Inorgánico de Valencia, Madrid y Barcelona; y 18 Instituciones del Campo Orgánico de Barcelona, Madrid, Valencia, La Laguna, Franckfurt, Oeiras (Portugal), Castellón de la Plana Salamanca y Pamplona.

Resultados y Discusión:

A continuación comentamos algunas de las publicaciones del Campo al que pertenecen 3 de los autores de este trabajo.

Ultraestructura del Molluscum contagiosum:

Continúa siendo un virus enigmático, persistiendo la paradoja de que la inoculación experimental de dicho virus a membrana corioalantoidea de embrión de pollo es negativa e incluso añadiendo previamente a la misma inmunosupresores. Sin embargo la inoculación a cultivos de células embrionarias de riñón de hamster es positiva, sufriendo dichos cultivos efectos citolíticos al inyectar el virus.

En el trabajo de Mascaró y cols. se señaló por primera vez a nivel mundial en el Congreso de Cullera (Valencia) la presencia de unas formaciones tubuloides onduladas agrupadas en haces de longitud variable de un diámetro total de unos 120 amstrongs, rodeadas de un material granular denso en el hígado de un paciente de protoporfiria

eritropoyética. El 4 de Diciembre de 1990 en un Symposium sobre porfirias celebrado en Atlanta (USA) se citó el trabajo del libro que estamos comentando.

Por otra parte, en dicho libro Nasemann (Alemania) hizo un interesante estudio de la relación entre los virus y la carcinogénesis con particular atención al melanoma.

En dicho trabajo se preguntaba ¿Son los virus responsables de la aparición del melsnoma? contestaba Nasemann diciendo "No existen pruebas que permitan afirmar la etiología vírica del melanoma maligno"... "Se conocen más de 120 especies de virus patogénicos para el hombre, o que son parásitos tisulares. Una dificultad es que los virus no pueden ser demostrados durante la fase de eclipse, lo que puede ocurrir en los virus de las células tumorales. A pesar de todas estas dificultades la investigación de los virus como posible causa de los tumores debe continuarse en tanto no tengamos respuestas contundentes a todos los interrogantes actuales sobre carcinogénesis".

Dichas afirmaciones, que se hicieron hace 18 años en Cullera (Valencia), siguen siendo vigentes ahora en 1990.

Bibliografía

1. LIBRO DE COMUNICACIONES PRESENTADAS A LA V REUNION DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MICROSCOPIA ELECTRONICA. Cullera (Valencia) 2 al 4 de Noviembre de 1972. Edit. UNIVERSIDAD POLITECNICA DE VALENCIA. Valencia 1973. 247 pág.
2. MASCARO, J.M.; PIÑOL-AGUADE, J.; GALY-MASCARO, C.; BRUGUERA, M. y ESQUERDA, J.E. Microscopía electrónica del hígado en la protoporfiria eritropoyética. En: (1) pág. 172-173.
3. NASEMANN, Th. Relación entre virus y carcinogénesis con particular atención al melanoma. En: (1), pág. 183-185.
4. CALAP, J.; TORRES, V.; FERRES, R. y E. MARQUES. Molluscum contagiosum ultraestructura. Investigación experimental. En: (1) pág. 64-66.

CARACTERISTICAS ULTRAESTRUCTURALES DEL DESARROLLO DE LOS GANGLIOS ESPINALES EN EL SAPO CORREDOR (Bufo calamita)

M. P. ALVAREZ, M. T. SOLAS, B. FERNANDEZ.

BIOLOGIA CELULAR

Fac. Biología. Univ. Complutense. 28040 Madrid. Con la colaboración del Servicio de Microscopía Electrónica de la U.C.M.

Introducción: Los estudios a microscopía electrónica sobre el desarrollo de los ganglios raquídeos han estado centrados en diferentes aves y mamíferos (PANNESE 1969, TENNYSON 1970). Los datos ultraestructurales de ganglios espinales en vertebrados inferiores son en su mayor parte relativos al adulto (Ver revisión PANNESE 1981, MATSUMOTO y ROSENBLUTH 1986, 1988).

Presentamos a continuación los resultados obtenidos al estudiar los ganglios raquídeos en el sapo corredor, separando tres estadios: renacuajo, sapo joven y sapo adulto. Los resultados de las pruebas inmunocitoquímicas fueron ya comunicados (ALVAREZ y col. en prensa).

Material y Métodos: Empleamos 8 ejemplares adultos, 8 jóvenes y 10 renacuajos de sapo corredor (Bufo calamita). Los animales adultos fueron perfundidos y el resto se fijó por inmersión. Como fijador se empleó paraformaldehído al 2,5%-glutaraldehído al 0,1% en tampón fosfato. Los ganglios espinales de los individuos adultos así como la zona central (médula y ganglios espinales) fueron procesados según la metodología convencional hasta su inclusión en araldita. Tras la selección de áreas mediante cortes semi-finos se procedió a la obtención de cortes finos, los cuales fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo. Se utilizó un microscopio electrónico Zeiss 902.

Resultados y Discusión: Los ganglios raquídeos de renacuajos son formaciones ovaladas en las que los elementos celulares se muestran poco diferenciados. No existe cápsula, si bien se observan elementos fibroblásticos y células pigmentarias a su alrededor. Los glioblastos son muy poco numerosos en comparación con los neuroblastos los cuales contactan directamente entre sí. (1)

Los ganglios raquídeos no caudales prosiguen su diferenciación y al llegar a la fase juvenil se observa ya una cápsula completa si bien muy fina. En ella los fibroblastos constituyen una primera capa a modo de red o malla que emite cortas evaginaciones hacia el exterior. También participan células pigmentarias y elementos conjuntivos fibrilares. Las células gliales son aún poco abundantes. Presentan un aspecto electrodenso y un gran volumen nuclear. Se asocian a fibras o a somas neuronales, pero en algunos casos se observan en relación con ambos. No existe aún corona glial perineuronal. (2)

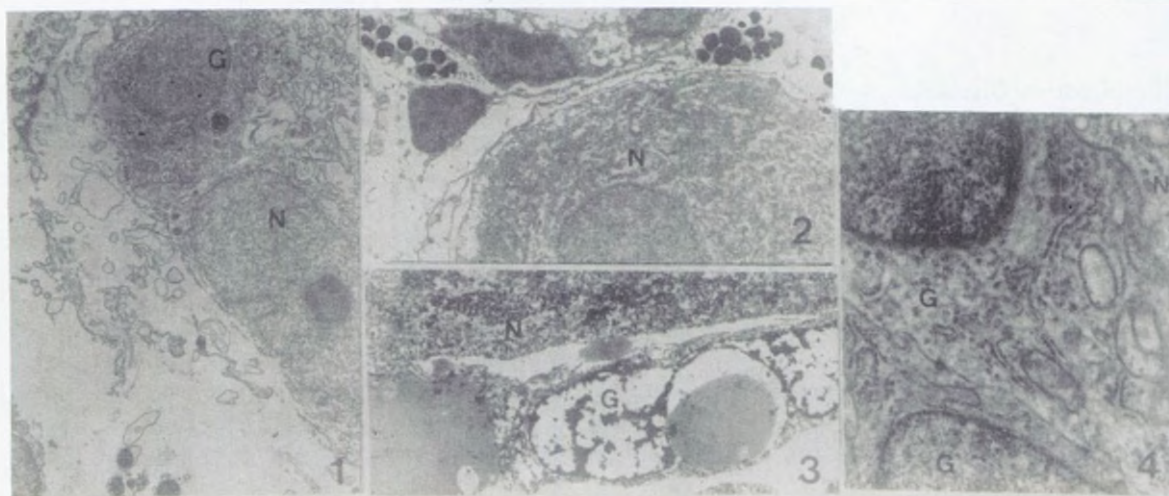
Los ganglios raquídeos caudales, por contra, comienzan un deterioro progresivo que acabará con la degeneración de todos los elementos ganglionares.(3)

Los sapos adultos muestran ganglios espinales similares a los de mamíferos (ALVAREZ y col. 1988b). En ellos las neuronas sensitivas aparecen rodeadas por una corona de naturaleza glial. Nuestros resultados histoquímicos indican una gran similitud entre los gliocitos perineuronales raquídeos de anfibio y de mamífero y demuestran su naturaleza astrocitaria (ALVAREZ y col. en prensa). Desde el punto de vista ultraestructural nuestras imágenes son similares a las de MATSUMOTO y ROSENBLUTH (1986, 1988) en ganglios raquídeos de rana. Constatamos asimismo grandes semejanzas con los ganglios simpáticos de mamíferos (ALVAREZ y col. 1988a) y de anfibios (TAXI 1976).

BROWN (1946) llevó a cabo un estudio de la metamorfosis haciendo especial énfasis en los cambios que afectan al sistema nervioso. Esta autora señala que el tejido nervioso es el último en mostrar signos degenerativos. En este sentido nuestras imágenes muestran primero una clara hipertrofia del conjuntivo para terminar luego con una degeneración generalizada.

El desarrollo y la diferenciación de los ganglios raquídeos parece seguir los esquemas descritos en mamíferos en fases prenatales (PANNESE 1969, TENNYSON 1970).

Bibliografía ALVAREZ MP y col. Arch Biol 99, 465-472 (1988a). ALVAREZ y col. Arch Biol 99, 473-479 (1988b). ALVAREZ MP y col. J Hirnforsch(en prensa). BROWN ME. Am J Anat 78, 79-113 (1946). MATSUMOTO y ROSENBLUTH. Anat Rec 215, 182-191 (1986). MATSUMOTO y ROSENBLUTH J Neurocytol 17, 425-432 (1988). PANNESE E. J Comp Neurol 135, 381-422 (1969). PANNESE E. Advances in Anat, Embryol, Cell Biol. 65.(1981). TAXI J. In Frog Neurobiology. 93-150 (1976). TENNYSON VM. In Developmental Neurobiology III, 47-116 (1970).



ESTUDIO DEL PLEXO MIENTERICO DE LA RATA MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO.

M. P. ALVAREZ, M. T. SOLAS, B. FERNANDEZ.

Biología Celular

Fac. Biología. Univ. Complutense. 28040 Madrid. En colaboración con los Drs. GABELLA y BALUK del Depto. de Anatomía y Embriología del Colegio Universitario de Londres.

Introducción: Diferentes estudios ultraestructurales e inmunocitoquímicos han demostrado que los ganglios del sistema nervioso entérico (SNE) se asemejan más al sistema nervioso central (SNC) que al resto de los ganglios del sistema nervioso periférico (SNP) (ver revisión GABELLA 1987).

En nuestro estudio sobre el plexo mientérico de la rata llevamos a cabo una aproximación tridimensional con vistas a conocer la citoarquitectura. Para ello combinamos la microscopía electrónica de barrido con técnicas de digestión que nos permitieran visualizar el plexo. Esta metodología fue introducida en 1980 por FUJIWARA y UEHARA.

Material y Métodos: Ratas Winstar de diferentes edades fueron anestesiadas, extrayéndose a continuación la región ilíaca. El material fue dividido en grupos. Dichos grupos eran sometidos a la acción de una solución de tripsina a 37° C en tiempos progresivos desde 0 (controles) a 50 min. Tras esta hidrólisis enzimática el material era fijado en glutaraldehído al 5% en tampón fosfato pH 7,4. Seguidamente todas las muestras se transferían a un baño de HCl 8 N a 60° C durante 30 min. Posteriormente las muestras eran deshidratadas (series de etanoles, acetato de isoamilo, punto crítico), montadas en soportes y sombreadas (sputter coating). Para su observación se empleó un microscopio electrónico de barrido Hitachi S-530.

Resultados y Discusión: Las muestras control fueron sometidas a digestión química pero no enzimática. Cuando estas muestras están siendo deshidratadas es posible constatar a la lupa la capa muscular longitudinal en algunas zonas. Con la ayuda de unos fórceps es posible eliminarla dejando así expuesto el plexo mientérico. La observación de las muestras control permite ver la disposición en malla del plexo, las células intersticiales de Cajal (CIC) y la capa muscular circular subyacente. Los ganglios del plexo mientérico (G) muestran una superficie lisa en la que se distinguen piezas irregulares y que encajan entre sí como un puzzle. La imagen resultante es de gran compactación.

La digestión enzimática en combinación con la química lleva a la alteración de los componentes ganglionares y a la desaparición de las células intersticiales de Cajal. La superficie ganglionar deja de ser lisa o suave

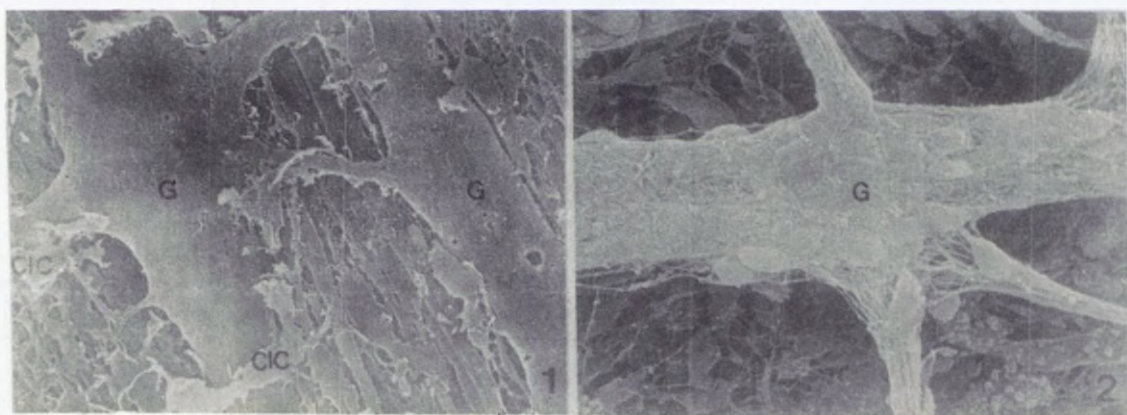
Algunos componentes ganglionares son eliminados, otros modifican su morfología y como resultado se observan huecos o ventanas entre elementos globulares. La idea de compactación se pierde, siendo las alteraciones tanto mayores cuanto mayor es el tiempo de acción de la tripsina. Los resultados obtenidos fueron similares en todas las edades estudiadas (desde recién nacidos hasta 2 meses). Las muestras sometidas a más de 30 min. fueron descartadas debido a la presencia de restos de la digestión que hacían imposible una observación fiable.

Nuestros resultados se muestran en concordancia con los de FUJIWARA y UEHARA (1980) y KOMURO (1986). El hecho de que los ganglios del SNE presenten en su superficie tanto elementos gliales como neuronales nos impide saber cuáles son los que ofrecen mayor resistencia al tratamiento y cuáles se ven antes alterados. Sería de gran utilidad poder combinar este tipo de estudios con marcajes.

Si bien la metodología aplicada es drástica estudios recientes han mostrado en ganglios raquídeos resultados similares aplicando scanning junto con técnicas digestivas, y microscopía electrónica de transmisión (PANNESSE y col. 1990a, b).

- Bibliografía:**
1. FUJIWARA T, UEHARA Y. J Electron Microsc. 29, 397-400 (1980).
 2. GABELLA G. In Physiology of the gastrointestinal tract. Raven Press. New York. 335-381 (1987).
 3. KOMURO T. Neurosci. lett 72, 49-53 (1986).
 4. PANNESSE E, LEDDA M, CONTE V, PROCACCI P. Anat Embryol 181, 427-432 (1990)
 5. PANNESSE E, LEDDA M, CONTE V, PROCACCI P, MATSUDA S. Cell Tissue Res 260, 167-173 (1990).

1. Muestra control. 2. Muestra sometida a 20' de tripsinización.



ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL PRELIMINAR DEL CEREBELO DE RATA TRATADA CON DIACETILMORFINA

APARICIO JF, CASARES JA, POBLADOR MS, ROJAS C, RAYA A, LANCHO JL,

DPTO. CIENCIAS MORFOLOGICAS

FACULTAD DE MEDICINA DE CORDOBA

Introducción:

La heroína (diacetilmorfina) es un alcaloide fenantrénico semisintético que se obtiene por acetilación de la morfina. La vía parenteral ofrece una mayor biodisponibilidad de la droga. En la sangre se une en parte con el fibrinógeno (COMPARINI, 1985), atraviesa rápidamente la barrera hematoencefálica (OLDENDORF, HYMAN, BRAUN, OLDENDORF, 1972). Se metaboliza en los sistemas microsomales hepáticos. Se excreta por riñón, pequeñas cantidades pasan al sudor y jugo gástrico (LITTER, 1975) y un 10% aparece en heces (JAFEE, MARTIN, 1981).

Material y Métodos: han utilizado 20 ratas cepa WISTAR (peso vivo: 195-250 g) mantenidas en condiciones estandar. En el grupo experimental se establecieron dos sublotos, uno de 15 ratas tratadas y otro de 5 ratas control. Los animales fueron tratados con heroína tipo BROWN SUGAR (heroína n° 3), a una dosis de 23,65 mg/kg/día (equivalentes a 0,66 mg/kg de heroína pura) durante 21 y 24 días. A los animales control se les administró la misma dosis de suero fisiológico salino. La vía de administración fué la intraperitoneal. Se recogió la orina de 24 horas y fue estudiada cromatográficamente. Los cerebelos fueron sumergidos en una solución fijadora de Glutaraldehído al 5% en tampón fosfato SØRENSEN 0,1 M a pH 7,3. A los 8 animales restantes se les practicó perfusión vascular sistémica. A continuación fueron post fijados con tetraóxido de osmio al 1%, deshidratados e incluidos en solución ascendente de araldita.

Resultados y Discusión:

La referencia bibliográfica realizada sobre la drogadicción va encaminada a detallar las diferentes repercusiones que los opiáceos, y en nuestro caso la diacetilmorfina (DAM), ejercen en el plano social o psicológico sin hacer referencia a la base morfoestructural que las sostiene.

Durante nuestro trabajo el animal de experimentación ha presentado una hiperactividad por un lado y por otro fenómenos estereotáxicos basados en la estimulación que la diacetilmorfina ejerce sobre los reflejos monosinápticos y la inhibición sobre los polisinápticos (GROLLMAN Y GROLLMAN, 1970).

La DAM en nuestras condiciones experimentales, detalladas en el apartado Material y Técnicas, no provoca alteraciones morfológicas cualitativas en comparación con la citología normal de la Corteza Cerebelosa de los animales control.

Referente a los diferentes subtipos neuronales observados (células de Purkinje, células estrelladas, células en cesta, granos y células Golgi tipo II) dentro de las dos capas,

molecular y granulosa, de la Corteza Cerebelosa, no hemos encontrado datos que diferencien la citología de los animales tratados con respecto a los animales control.

El análisis cromatográfico de la orina de 24 horas muestra un valor de 26,59ng/ml, lo que entra dentro de la normalidad en nuestro estudio.

Todo lo anteriormente reseñado nos hace pensar que, según la dosis administrada de DAM en nuestras condiciones experimentales; dicho tóxico no produce una actividad degenerativa en todos los subtipos celulares estudiados.

Bibliografía:

- CUMARINI TB, Binding features of diacetylmorphine (heroin) in whole blood and in blood fractions, Biophys J 1985; 48: 247-51.
- GARRIDO R, Toxicología y toxicomanías, Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid 1985.
- GROLLMAN A, GROLLMAN EF, Pharmacology and therapeutics, Ed. Lea and Febiger 1970.
- JAFFE JH, MARTIN WR, Analgésicos y antagonistas opiáceos, En: GOODMAN and GILMAN'S, Las bases farmacológicas de la terapéutica, Ed. Panamericana 1981; 494-532.
- LITTER M, Hipnoanalgésicos naturales y sintéticos, En: Farmacología, Ed. Librería el Ateneo 1975; 373-408.
- OLDENDORF WH, HYMAN S, BRAUN L, OLDENDORF SZ, Blood brain barrier, Penetration of morphine, codeine, heroin and methadone after carotid injection, Science 1972; 178: 984-6.

Estudio comparado de la ultraestructura de los tentáculos de dos especies de Foronídeos (Lophophorata)

Benito J., Aguirre A., Emig C. C., Fernández I., Pardos F. y Roldán C.

Departamento de Biología Animal I, Facultad de Biología, Universidad Complutense, 28040 Madrid

Introducción:

El lofóforo de los Foronídeos tiene una función respiratoria, protectora y de alimentación. En sus tentáculos se distinguen 4 zonas: frontal, abfrontal, y laterales. La estructura de un tentáculo consiste en una epidermis monoestratificada que descansa sobre la membrana basal y una capa peritoneal rodeando el celoma lofoforal y el vaso sanguíneo. En la base de la epidermis y en la del peritoneo se observan fibras nerviosas. Las dos especies que se comparan poseen hábitats diferentes: *Phoronis australis* vive en el interior de la pared del tubo del Antozoo *Cerianthus*, mientras que *Phoronis hippocrepia* fabrica su tubo perforando un substrato duro. *P. australis* posee un lofóforo enrollado en espiral con 600-1000 tentáculos, en cambio *P. hippocrepia* tiene menos tentáculos (hasta 150) que se disponen en forma de herradura.

Material y Métodos:

Se han utilizado individuos adultos de *Phoronis hippocrepia* recogidos en la costa próxima a Marsella a una profundidad de 10 m y de *Phoronis australis* de la costa de Almería a 2-3 m de profundidad. Se fijaron en glutaraldehído al 4% en agua de mar filtrada y post fijados en OsO_4 al 1% en agua de mar filtrada. Posteriormente fueron deshidratados e incluidos en Araldita por el método habitual. Las secciones fueron realizadas con un ultramicrotomo LKB III, posteriormente teñidas con citrato de plomo y observadas y fotografiadas en un Philips EM201.

Resultados y Discusión:

La **epidermis** es un epitelio simple que presenta células columnares en la cara frontal y cuboidales en la abfrontal (Fig. 1). Se distinguen las siguientes categorías celulares: células de soporte, células sensoriales, células glandulares y células "adhesivas" (Fig. 1, 2). **a) células de soporte**, monociliadas, semejantes en las dos especies. Son el principal tipo celular y forman la ciliación del tentáculo. Tienen largas microvellosidades cubiertas por un glicocalix filamentosos. En *P. hippocrepia* se observan en la parte apical gránulos electrondensos como en la epidermis del tronco (Aguirre *et al.*, 1991), que no aparecen en *P. australis* (Pardos *et al.*, 1991) (Fig. 2). **b) células sensoriales**, monociliadas de tipo coanocito. Están dispuestas en dos filas longitudinales latero-frontales. En ambas especies, el cilio está rodeado por una corona de ocho microvellosidades que tienen bandas longitudinales de microfibrillas, aunque en *P. hippocrepia*, las microvellosidades tienen un desarrollo más importante con bandas de microfibrillas más patentes. **c) células glandulares**, localizadas principalmente en la cara abfrontal del tentáculo. En *P. hippocrepia*, la presencia de células glandulares destaca por su número y diversidad: se han diferenciado 3 tipos que coinciden con los descritos en la epidermis del tronco (células mucosas, células NAM1 y NAM3 (Aguirre *et al.*, 1991) (Fig. 2), de ellos únicamente las células mucosas están presentes en

los tentáculos de *P. australis* (Pardos *et al.*, 1991). **d) células "adhesivas"**, localizadas en la cara frontal. Son escasas y presentan una estructura semejante en ambas especies. Están provistas de numerosos gránulos ovalados (0.3-0.1 μm) y presentan procesos digitiformes que sobrepasan la capa de microvellosidades. Estas células son diferentes de las de la epidermis del tronco, descrita por Fernández *et al.* (en prensa); sugerimos para esas células una función adhesiva para la captura de las partículas alimentarias ya que son semejantes a las células adhesivas de la epidermis de Turbellarios (Tyler, 1976, 1984).

En la base de la epidermis se observa un **plexo nervioso** constituido por dos grupos de fibras nerviosas, uno frontal y otro abfrontal. En *P. australis* es mucho más patente el de la cara abfrontal (Pardos *et al.*, 1991) mientras que en *P. hippocrepia* los dos grupos de haces nerviosos están muy desarrollados (Fig. 3).

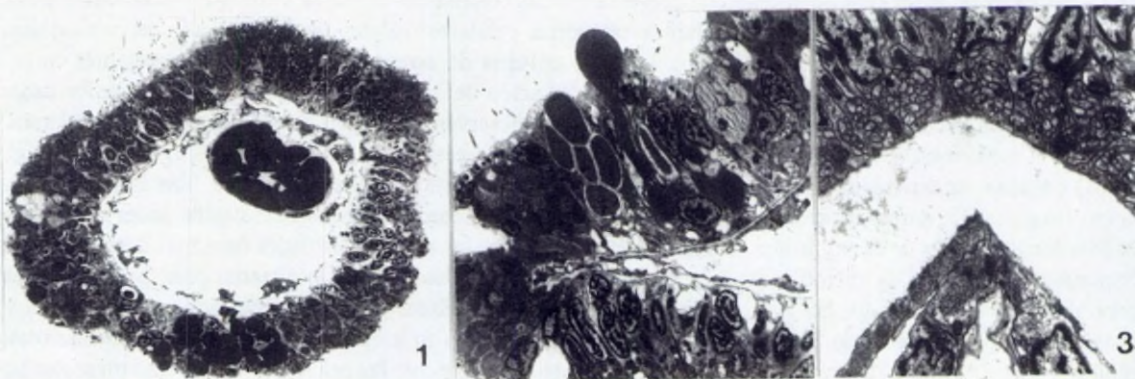
La **membrana basal**, similar en las dos especies, consiste en fibras de colágeno que se disponen en dos capas con distinta orientación: circular cerca de la epidermis y longitudinal cerca del peritoneo (Fig. 3).

En ambas especies, las **células peritoneales** son monociliadas y de naturaleza mioepitelial, con miofilamentos longitudinales (Fig. 3). Llevan asociados **axones** que se sitúan entre las células peritoneales y la membrana basal.

Igualmente, en el interior de la cavidad celómica, a lo largo de la cara frontal, se dispone un único **vaso sanguíneo** con idéntica estructura en las dos especies: una capa de células mioperitoneales, con miofilamentos circulares, sobre una fina lámina basal que se continua con la membrana basal del tentáculo (Fig. 3); no hay endotelio (Pardos *et al.*, 1991).

Bibliografía:

- Aguirre A., Benito J., Emig C. C., Fernández I., Pardos F. y Roldán C. 1991. Ultraestructura de la epidermis de *Phoronis hippocrepia* (Phoronida). *Actas XVI Reun. Bien. Soc. Microsc. Electr.*, Cádiz 1990, p.00-00.
- Fernández I., Aguirre A., Pardos F., Roldán C., Benito J. and Emig C. C. (en prensa). The epidermis of *Phoronis psammophila* Cori (Phoronida, Lophophorata): an ultrastructural and histochemical study. *Can. J. Zool.*
- Pardos, F., Roldán, C., Benito, J., and Emig, C. C. 1991. Fine structure of the tentacles of *Phoronis australis* Haswell (Phoronida, Lophophorata). *Acta Zool.* 72 (2): en prensa.
- Tyler, S. 1976. Comparative ultrastructure of adhesive systems in the Turbellaria. *Zoomorphology* 83: 1-76.
- Tyler, S. 1984. Turbellarian Platyhelminths. In: *Biology of the Integument*. 1. Invertebrates, J. Bereiter Hahn, A. G. Matolsky & K. S. Richards (Eds), pp. 112-131, Springer-Verlag, Heidelberg.



ULTRAESTRUCTURA DE LAS CELULAS NO LINFÓIDES DEL TIMO DE Dicentrarchus labrax (L.)

Avilés-Trigueros, M.; Villena, M.I.; Navarro, V.; Quesada, J.A.

Departamento de Biología Celular.

Facultad de Biología. Universidad de Murcia. Murcia.

Introducción:

El timo es un órgano propio de vertebrados, de gran trascendencia para el conocimiento de la evolución de la inmunidad adaptativa. Se asume, generalmente, que el microambiente tímico es creado por las células no linfoides (células reticuloepiteliales, macrófagos, etc.), que inducen la diferenciación y maduración de los linfocitos.

Los peces ocupan una posición clave en la filogenia de los vertebrados por ser el primer grupo que presenta respuesta inmune celular y humoral, por lo que su estudio se considera de sumo interés desde el punto de vista de la Inmunología Comparada.

El presente trabajo describe la ultraestructura del timo de lubina, Dicentrarchus labrax (L) (Pisces; Teleostei), con especial referencia a las células no linfoides.

Material y Métodos:

Se usaron ejemplares de Dicentrarchus labrax (L.) (lubina) procedentes de la Planta Experimental de Cultivos Marinos de la Comunidad Autónoma de Murcia, mantenidos en condiciones próximas a las de su hábitat natural, con edades comprendidas entre 1 y 2 años, peso variable entre 129,0g y 385,7g y de ambos sexos.

El timo fue extirpado asépticamente, fijado por inmersión en glutaraldehído al 2% en tampón cacodilato 0,1M (pH: 7,2-7,4), postfijado en tetróxido de osmio al 1% en el mismo tampón, deshidratado en alcohol e incluido en Epon 812. Secciones de 0,4µm teñidas con solución alcalina de azul de toluidina fueron usadas para seleccionar las áreas tímicas más adecuadas. De las áreas seleccionadas se realizaron secciones ultrafinas con un ultramicrotomo Reichert-Jung Ultracut E, se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo y fueron examinadas en un microscopio electrónico Zeiss EM-10C.

Resultados y Discusión:

Los componentes celulares no linfoides del timo de lubina presentan las siguientes características ultraestructurales:

Células mucosas aparecen aisladas o en pequeños grupos, debajo del epitelio o dispersas en el parénquima tímico. Se observan distintas etapas de formación. Las células jóvenes presentan núcleo central abundante y numerosas cisternas de RER (Fig.1,X4.725). Posteriormente se desarrolla un aparato de Golgi con numerosos lisosomas perinucleares, aparecen cisternas de RER dilatadas y grandes vacuolas de contenido claro finamente granular. En la etapa final, el citoplasma está ocupado por vacuolas de contenido mucoso y escasas organelas desplazadas a la periferia (Fig.2,X3.750), células semejantes a estas se describen en Lophius piscatorius (2). Células mucosas de aspecto similar a las células mucosas parenquimáticas maduras aparecen entre las células del epitelio limitante (Fig.3,X2.500), secretando el contenido vacuolar en la cavidad branquial, al igual que Salmo gairdneri (1) y Sciaenops ocellatus (3).

Células reticuloepiteliales son de forma estrellada se unen por desmosomas y se distribuyen por todo el órgano constituyendo el citorretículo. Según su posición y características ultraestructurales distinguimos

tres tipos: claras, oscuras y limitantes. Las células reticuloepiteliales claras (Fig.4,X4.000) son similares a las descritas en otros teleosteos y vertebrados superiores (5). Poseen núcleo eucromático de forma redondeada, abundantes haces de tonofilamentos dispersos en el citoplasma, más frecuentes en las prolongaciones citoplásmicas y entorno al núcleo como se ha descrito en S. sanguineus (3). A veces se observan raíces ciliares en las proximidades del núcleo.

Las células reticuloepiteliales oscuras (Fig.5,X3.750) son de menor tamaño y de mayor electronodensidad, se localizan en las proximidades de las trabéculas y del tejido conjuntivo subyacente frecuentemente envolviendo células en división e involutivas. Poseen abundantes haces de tonofilamentos en las prolongaciones citoplásmicas y vacuolas de contenido claro.

Las células reticuloepiteliales limitantes (Fig.6,X3.750) se unen fuertemente entre sí por desmosomas e interdigitaciones, poseen citoplasma escaso y electronodenso. Estas células forman una capa continua que separa el parénquima típico del conjuntivo trabecular y de todos los tejidos circundantes.

Macrófagos (Fig.7,X2.500) muestran una gran heterogeneidad en tamaño y contenido citoplásmico, presentando en algunos casos cisternas dilatadas de RER con inclusiones paracristalinas (Fig.7a,X20.000).

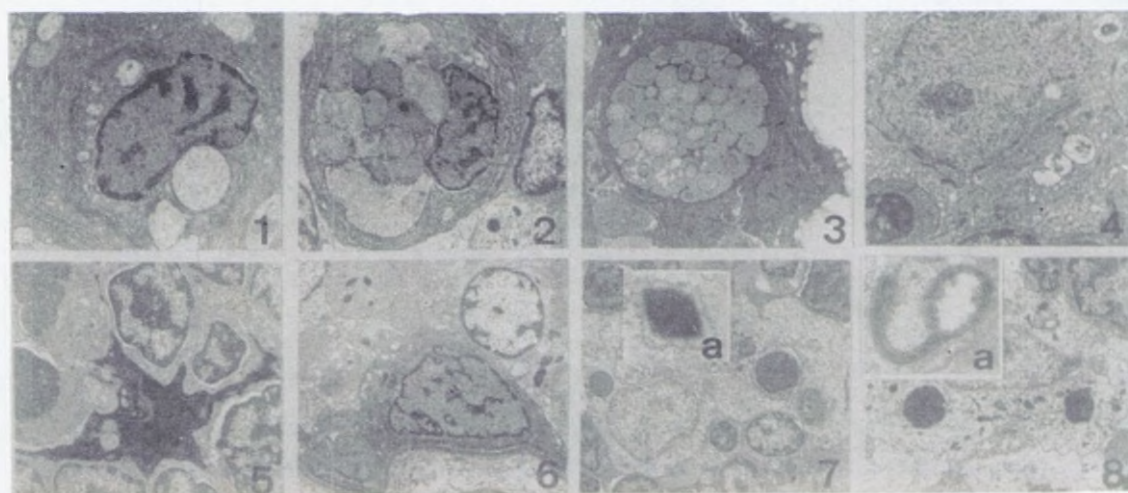
Células de baja electronodensidad (Fig.8,X6.600) caracterizadas por poseer estructuras semejantes a los gránulos de Birbeck (Fig.8a,X21.875) descritos en las células de Langerhans y en las células interdigitadas de vertebrados superiores y no observadas con anterioridad en peces.

Granulocitos heterófilos y eosinófilos aparecen distribuidos irregularmente.

Células micoides similares a las encontradas en timo de otros vertebrados (4), también se observan.

Bibliografía:

- 1.- CHILMONCZYK, S. (1.983). Dev. Comp. Immunol. 7:59-68.
- 2.- FÄNGE, R y PULSFORD, A. (1.985). Fish Immunology. Ed. M.J. Manning and M.F. Tatner. London, Academic Press. pp:293-311.
- 3.- GORGOLLON, P. (1.983). J.Morph. 177:25-40.
- 4.- RIMMER, J.J. (1.980). Dev. Comp. Immunol. 4:385-394.
- 5.- SIGH, J. (1.980). The thymus gland. Ed. M.D. Kendall. London, Academic Press. pp:133-150.



Estomatitis por amalgama conteniendo mercurio, estaño y plata.
Estudio con microanálisis con rayos X (EMMA).

CALAP, J.; PADRON, J.J.; CASTILLA, M.A.; VILCHES, J.

Medicina (Dermatología)

Facultad de Medicina. Universidad de Cádiz.

Introducción:

Las técnicas de microanálisis aplicadas a la Biología fueron empleadas hace bastantes años por diversos grupos de investigación. Nosotros empezamos a emplearlas en el Pseudoxantoma elástico en 1975 (Congreso de la Sociedad Europea de Patología. Viena) (1). Vilches (2) hizo hincapié en las posibilidades del microanálisis en Biología.



Material y Métodos:

Varón de 50 años que desde hace 5 es portador de una prótesis metálica, desde hace 6 meses presenta un proceso inflamatorio de la mucosa yugal conectando con dicha prótesis. Se realiza un estudio microanalítico con un ME SEM JEOL JSM 820 de la amalgama productora de la estomatitis.

Resultados y Discusión:

El análisis detecta la presencia de titanio, rubidio, estaño, plata, bromo y mercurio. El elemento predominante es el mercurio y en menor cantidad el estaño y la plata. La estomatitis por amalgama conteniendo mercurio, plata y estaño no son muy frecuentes por lo que nos ha parecido de interés esta comunicación.

Bibliografía

1. CALAP, J. ALONSO, J y MASCARO, J.M. Scanning E.M. and X ray spectrometryc study of the mineral deposits in pseudoxanthoma elasticum. En: Abstracts of Fifth Congress of the European Society of pathology Leopold Wetzel Vienna pág.82. (Vienna 1975).
2. VILCHES J. Microanálisis en Biología. En: Seminario de introducción al microanálisis en microscopía electrónica con aplicación al campo biológico. Madrid, SEME (Sociedad de Microscopía Electrónica), 1983; 24-36.

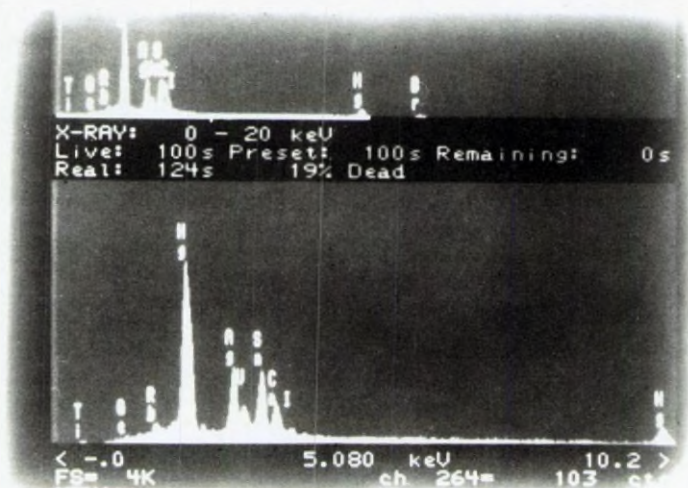


Imagen microanalítica de la amalgama metálica que produjo una estomatitis. Se observan los picos predominantes de Hg, Ti, Rb, Sn, Ag y Ca.

APLICACION DEL MICROANALISIS DE RAYOS X EN LA DETERMINACION DE ELEMENTOS INORGANICOS EN LA PARED DEL POLEN.

B. CARRETERO, P.V. CRESPO*, M.I. RODRIGUEZ-GARCIA.

Citología Vegetal. *Dept. de Biología Celular. Facultad de Medicina.

Est. Exp. del Zaidín, (CSIC). Profesor Albareda 1. 18008 Granada.

Introducción: La presencia de elementos inorgánicos en la pared del polen ya ha sido demostrada con anterioridad (Cerceanu-Larrival y Derouet, 1988). Dada la elevada actividad enzimática que tiene lugar en la superficie del polen (germinación, reacciones de compatibilidad e incompatibilidad), no es de extrañar la posible existencia de elementos que actúen como cofactores. Mediante la técnica del piroantimoniato (Spicer et al. 1969) es posible detectar al MET la presencia de cationes inorgánicos. Pero ello no da información acerca de la clase de elementos presentes. Se hace necesario recurrir al microanálisis para identificar los cationes localizados en la pared del polen.

Material y Métodos: Polenés maduros de olivo (*Olea europaea*) y tomate (*Lycopersicum esculentum*), fueron procesados de dos formas diferentes:

a) **Fijación química:** Glutaraldehído al 3% en tampón cacodilato 0.025M durante 2 horas, varios lavados en cacodilato, deshidratación en series progresivas de acetona, para terminar introduciendo las muestras en acetato de amilo. Finalmente las muestras se someten a punto crítico.

b) **Fijación física:** Las muestras se introducen directamente en nitrógeno líquido, donde se mantienen hasta que van a ser montadas en el portamuestras para someterlas a "freeze-dryer" durante 48 horas.

En ambos casos las muestras fueron montadas sobre un portamuestras de carbón mediante el uso de grafito coloidal, para luego ser recubiertas con una fina película de carbón. La observación se realizó con un MEB Philips 505 con una tensión de 18KV mediante un Analizador de Energía Dispersiva de Rayos X.

Resultados y Discusión: La variabilidad de los resultados obtenidos al aplicar el microanálisis de Rayos X para identificar los elementos presentes en la pared del polen, ha hecho que hayamos ido combinando el planteamiento inicial de este estudio. De acuerdo con nuestra hipótesis de trabajo, dentro de un mismo tipo de polen podría haber diferencia de elementos y concentración, según se tratase de la pared interapertural o de la región apertural por donde germina el tubo polínico. Sin embargo al hacer un análisis puntual notamos que estas diferencias se daban incluso dentro de una misma región, entre dos puntos cercanos. Esto nos llevó a hacer un estudio global de toda la pared rastreando toda su superficie, para obtener información acerca de los elementos presentes en ella, sin tener en cuenta en una primera aproximación las dos regiones más diferenciadas de la pared (apertural y no apertural).

Otro factor a tener en cuenta ha sido el tipo de fijación (física o química) utilizada en la preparación de las muestras. Los elementos detectados, tanto en olivo como en el tomate son P, S, Cl, K y Ca, no encontrándose grandes diferencias entre las dos especies estudiadas.

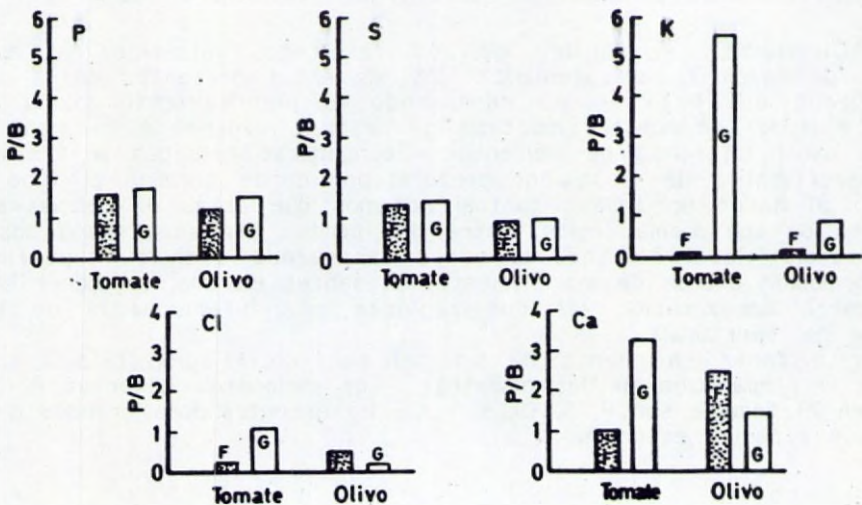
Pero el comportamiento de estas frente a la fijación química o física de las muestras es diferente en dependencia de los elementos. Se observó que la fijación química (glutaraldehído), tanto en el tomate como en el olivo introduce un ligero incremento del P y S, el cual se hace más notable en el caso del K. No resulta extraño que la fijación química pueda introducir algunos elementos adicionales que modifiquen los valores reales de los mismos. Por el contrario, en el caso del Cl y Ca, no se observa el mismo comportamiento de ambas especies, frente a los dos tipos de fijación. Mientras que en el tomate, la fijación química introduce un incremento de Cl y Ca, en el olivo se produce una disminución de estos elementos. Este diferente comportamiento del tomate y el olivo sólo frente al Ca y Cl, necesita de una mayor investigación antes de formular implicaciones fisiológicas. En la cuanto a la posible influencia de elementos inorgánicos en la reacción alérgica de ciertos pólenes (Cerceanu-Larrival y Derouet 1988), sólo podemos indicar que no hemos encontrado diferencias significativas en los elementos presentes en las dos especies estudiadas: el olivo (de carácter alérgico) y el tomate (al que no se le conoce como causante de alergias).

Este trabajo ha sido subvencionado gracias al Proyecto de la DGICYT PB87-03 38-C02-02

Bibliografía:

CERCEANU-LARRIVAL, M.T., DEROUET, L. (1969). Relation possible entre les éléments inorganiques détectés par spectrométrie X à sélection d'Énergie et l'allergénicité des pollens. Annales des Sciences Naturelles. 9, 133-152.

SPICER, S.S., GREENE, W.B., HARDIN, J.H. (1969). Nuclear precipitates in pyroantimoniate -osmium tetroxide- fixed tissues. J.Cell Biol. 39, 216-221



DEMOSTRACION DE NEUMOCITOS INCLUIDOS EN CARCINOMAS PULMONARES MEDIANTE EL ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL.

Luis Carretero Albiñana *. Emilio Alvarez Fernández **.

Anatomía Patológica.

* Hospital General Yagüe. Burgos.

** Hospital Gregorio Marañón. Madrid.

Introducción:

La presencia de alveolos incluidos en el seno de la masa tumoral ha sido descrita en el seno de varios tipos de neoplasias pulmonares, (1-4), no conociéndose en general su existencia, frecuencia, o características histológicas especiales que faciliten su diferenciación de las verdaderas luces neoplásicas presentes en los adenocarcinomas, y que lleva a considerar como tumores con doble diferenciación a diversas neoplasias pulmonares.

Material y Métodos:

Serie de 60 carcinomas pulmonares resecados quirúrgicamente y divididos en : 35 adenocarcinomas o carcinomas adenoescamosos, 19 carcinomas epidermoides y 6 carcinomas indiferenciados de células pequeñas (1).

Fragmentos tumorales cortados en cubos de 1 mm. fueron fijados en glutaraldehído al 2,5 %, postfijados en osmio, e incluidos en Epon para estudio ultraestructural; el resto de la lesión se fijó en formol tamponado al 10 % y se utilizó para el estudio de microscopía óptica.

En cada caso la presencia de alveolos incluidos fue evaluada en al menos tres bloques de parafina, mientras que ultraestructuralmente dichos espacios se localizaron en los cortes semifinos.

Resultados y Discusión:

Nueve de los carcinomas epidermoides y tres de los adenocarcinomas estudiados presentan pequeñas cavidades incluidas en el seno de la masa tumoral, algunas de las cuales están situadas en sus porciones centrales.

Estas luces están revestidas por células cúbicas isomorfas, que ultraestructuralmente corresponden en su mayor parte a neumocitos de tipo II, con abundantes y cortas microvellosidades y cuerpos multilamelares, ocasionales mitocondrias, cisternas de retículo endoplásmico rugoso y ribosomas libres; los núcleos son redondeados y de nucleolo único y de mediano tamaño. Algunas células son de características intermedias entre los neumocitos de tipo I y los de tipo II.

Las cavidades fueron numerosas en diez casos, encontrándose también neumocitos englobados de manera individual, y revistiendo espacios

alargados de aspecto pseudovasculár.

Estos hallazgos y otros referidos anteriormente en la literatura (1-4), demuestran que la inclusión de espacios alveolares en el seno de las neoplasias pulmonares es un hecho frecuente, especialmente en los carcinomas epidermoides.

En general esto puede ser reconocido en microscopía óptica de rutina por el isomorfismo de sus células y su pequeño tamaño en relación con los elementos neoplásicos vecinos, o mediante el uso de ciertas técnicas histoquímicas especiales (2, 5).

En otras ocasiones, y especialmente en el caso de los adenocarcinomas, es conveniente realizar un estudio ultraestructural.

Bibliografía

- 1.- McDowell EM, McLaughlin JS, Merenyl DK, Kieffer RF, Harris CC and Trump BF.- The respiratory epithelium. V. Histogenesis of lung carcinomas in the human. J Nat Cancer Inst 61: 587-606, 1978.
- 2.- Alvarez-Fernández E.- Alveolar trapping in pulmonary carcinomas. Diagn Histopathol 5: 59-64, 1982.
- 3.- Dingemans K and Mooi W.- Invasion of lung tissue by bronchogenic squamous cell carcinomas: Interaction of tumor cells and lung parenchyma in the tumor periphery. Int J Cancer 37: 11-19, 1986.
- 4.- Pääkkö P, Risteli J, Risteli L and Autio-Harmainen H.- Immunohistochemical evidence that carcinomas grown on alveolar basement membranes. Am J Surg Pathol 14 (5): 464-473, 1990.
- 5.- Alvarez-Fernández E and Carretero-Albiñana L.- Expression of blood group antigens by normal bronchopulmonary tissues and common forms of pulmonary carcinomas. Arch Pathol Lab Med (en prensa).

ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL PRELIMINAR DEL MUSCULO CARDIACO DE RATA TRATADA CON DIACETILMORFINA

CASARES JA, APARICIO JF, ROJAS C, POBLADOR MS, RAYA A, LANCHO JL.

DPTO. CIENCIAS MORFOLOGICAS

FACULTAD DE MEDICINA DE CORDOBA

Introducción:

La heroína (diacetilmorfina) es un alcaloide fenantrénico semisintético que se obtiene por acetilación de la morfina. La vía parenteral ofrece una mayor biodisponibilidad de la droga. En la sangre se une en parte con el fibrinógeno (COMPARINI, 1985), atraviesa rápidamente la barrera hematoencefálica (OLDENDORF, HYMAN, BRAUN, OLDENDORF, 1972). Se metaboliza en los sistemas microsomales hepáticos. Se excreta por riñón, pequeñas cantidades pasan al sudor y jugo gástrico (LITTER, 1975) y un 10% aparece en heces (JAFFE, MARTIN, 1981).

Material y Métodos:

Se han utilizado 20 ratas cepa WISTAR (peso vivo: 195-250 g) mantenidas en condiciones estandar. En el grupo experimental se establecieron dos sublotos, uno de 15 ratas tratadas y otro de 5 ratas control. Los animales fueron tratados con heroína tipo BROWN SUGAR (heroína nº 3), a una dosis de 23,65 mg/kg/día (equivalentes a 0.66 mg/kg de heroína pura) durante 21 y 24 días. A los animales control se les administró la misma dosis de suero fisiológico salino. La vía de administración fue la intraperitoneal. Se recogió la orina de 24 horas y fue estudiada cromatográficamente. Los cerebelos fueron sumergidos en una solución fijadora de Glutaraldehído al 5% en tampón fosfato SÖRENSEN 0,1 M a pH 7,3. A los 8 animales restantes se les practicó perfusión vascular sistémica. A continuación fueron post fijados con tetraóxido de osmio al 1%, deshidratados e incluidos en solución ascendente de araldita.

Resultados y Discusión:

La búsqueda bibliográfica que hemos realizado sobre la drogadicción generalmente detalla las diferentes repercusiones que los opiáceos, y en este caso la diacetilmorfina, ejercen sobre el plano socio-cultural o psicológico sin hacer alusión a la base morfológico-ultraestructural que las soporta.

La hiperactividad o excitación que el animal de experimentación ha presentado durante nuestro trabajo junto con la aparición de fenómenos estereotóxicos basados en la estimulación que la diacetilmorfina ejerce sobre los reflejos monosinápticos y la inhibición sobre los polisinápticos son hechos ya descritos por GROLLMAN Y GROLLMAN en 1970.

En nuestras condiciones experimentales, la diacetilmorfina, no provoca alteraciones ultraestructurales cualitativas en comparación con la citología normal de las células miocárdicas de los animales control.

Las fibrillas musculares estriadas cardíacas, discos intercalares y demás componentes habituales de la citología miocárdica no difiere de los observados en los animales control.

El análisis cromatográfico de la orina de 24 horas muestra un valor de 26,59 ng/ml, lo que entra dentro de la normalidad en nuestro estudio.

Todo lo anteriormente mencionado nos lleva a la conclusión que, según la dosis administrada de diacetilmorfina en nuestras condiciones experimentales, dicho tóxico no ejerce una actividad degenerativa en las fibras miocárdicas estudiadas.

- Bibliografía:**
- COMPARINI JB. Binding features of diacetylmorphine (heroin) in whole blood and in blood fractions, *Biophys J* 1985; 48: 247-51.
 - GARRIDO R. Toxicología y toxicomanías, Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid 1985.
 - GRÖLLMAN A, GRÖLLMAN EF. Pharmacology and therapeutics, Ed. Lea and Febiger 1970.
 - JAFFE JH, MARTIN WR. Opioid analgesics and antagonists, En: GOODMAN and GILMAN'S, The pharmacological basis of therapeutics, McMillan Publishing Co 1985.
 - LITTER M. Hipnoanalésicos naturales y sintéticos, En: Farmacología, Ed. Librería el Ateneo 1975; 373-408.
 - OLDENDORF WH, HYMAN S, BRAUN L, OLDENDORF SZ. Blood brain barrier. Penetration of morphine, codeine, heroin and methadone after carotid injection", *Science* 1972; 178: 984-6.

LOCALIZACION ULTRAESTRUCTURAL DE LISOZIMA Y GLUCOPROTEINAS EN LA MUCOSA BRONQUIAL HUMANA. RELACION CON LOS PROCESOS DE N- Y O- GLUCOSILACION

M.T. Castells, J.F. Madrid, J. Garrido, F. Hernández y J. Ballesta
Sección de Histología y Embriología General. Facultad de Medicina.
Murcia

Introducción:

La secreción bronquial humana contiene gran cantidad de componentes constituyendo una importante barrera de protección de las vías aéreas. Se ha identificado lisozima en las glándulas serosas y glucoproteínas en glándulas serosas, mucosas y células caliciformes del epitelio superficial (Boat and Cheng 1980; Mazzuca et al. 1982; Castells et al. 1990a,b). Nuestro objetivo es caracterizar estas macromoléculas en la mucosa bronquial humana haciendo especial referencia a su proceso de biosíntesis.

Material y Métodos:

Muestras de mucosa bronquial humana normal fueron obtenidas de tomas biópsicas. Para microscopía de luz, las muestras fueron fijadas en 10% formol e incluidas en parafina. Se aplicaron las siguientes lectinas conjugadas con peroxidasa: ConA (20 µg/ml), HPA (6 µg/ml), PNA (12 µg/ml) y WGA (6 µg/ml). En algunas secciones se realizó pre-tratamiento con neuraminidasa. Para la detección de lisozima se desarrolló la técnica de PAP empleando anticuerpos contra lisozima humana (1:300). Para microscopía electrónica, las muestras fueron fijadas en glutaraldehído al 2% e incluidas en Lowicryl K4M. Secciones ultrafinas fueron tratadas con ConA-HRP-oro, DSA-ovomucoide-oro, HPA-oro, WGA-ovomucoide-oro y LFA-fetuina-oro con y sin pre-tratamiento con neuraminidasa. La detección inmunocitoquímica de lisozima en microscopía electrónica se realizó mediante una técnica indirecta utilizando oro coloidal como marcador.

Resultados y Discusión:

El glucocalix de los cilios y microvellosidades de las células ciliadas fue reactivo a DSA, ConA, WGA y LFA. Las células caliciformes mostraron afinidad por WGA y LFA en sus gránulos. En las células glandulares mucosas, las cisternas cis del aparato de Golgi fueron marcadas por ConA, DSA y HPA mientras que las trans fueron afines a DSA, WGA y LFA (Fig. 1). Los gránulos mucosos en formación y los maduros reaccionaron intensamente con WGA y LFA. DSA fué positivo en ambos gránulos después de

digestión con neuraminidasa. En las células glandulares serosas, las cisternas del retículo endoplasmico rugoso fueron reactivas a ConA y DSA. La zona trans Golgi mostró afinidad por WGA y LFA. Los gránulos secretores fueron intensamente marcados por ConA, DSA, WGA y LFA (Fig. 2). Sólo se detectó inmunoreactividad a lisozima en los gránulos serosos.

En conclusión, las células caliciformes, ciliadas y glándulas serosas y mucosas contienen glucoproteínas cuya secuencia final es ácido siálico-Gal β (1-4) GlcNAc. Las células mucosas glandulares y caliciformes contienen principalmente O-glucoproteínas aunque también presentan N-glucoproteínas del tipo complejo. Las células ciliadas contienen N-glucoproteínas y las células serosas contienen mezcla de N- y O-glucoproteínas que serían empaquetadas junto a lisozima.

Bibliografía:

- Boat T.F., Cheng P.W. (1980): Biochemistry of airway mucus secretions. *Federation Proc.* 39, 3067.
- Castells M.T., Ballesta J., Pastor L.M., Madrid J.F., Marin J.A. (1990a): Histochemical characterization of glycoconjugates in the epithelium of the extrapulmonary airways of several vertebrates. *Histochem. J.* 22, 24.
- Castells M.T., Ballesta J., Madrid J.F., Avilés M., Martínez-Menárguez J.A. (1990b): Characterization of glycoconjugates in developing rat respiratory system by means of conventional and lectin histochemistry. *Histochemistry* (in press).
- Mazucca M., Lhermitte M., Lafitte J.J., Roussel P. (1982): Use of lectins for detection of glycoconjugates in the glandular cells of the human bronchial mucosa. *J.Histochem. Cytochem.* 30, 956.

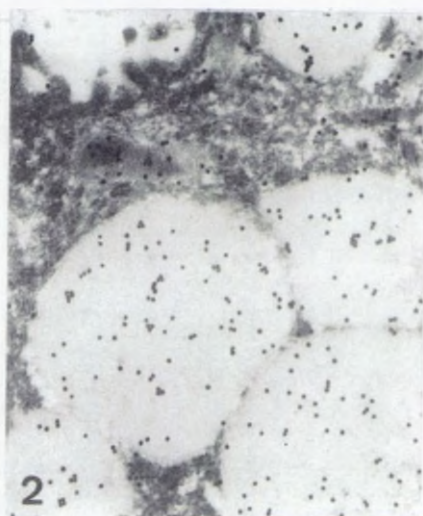
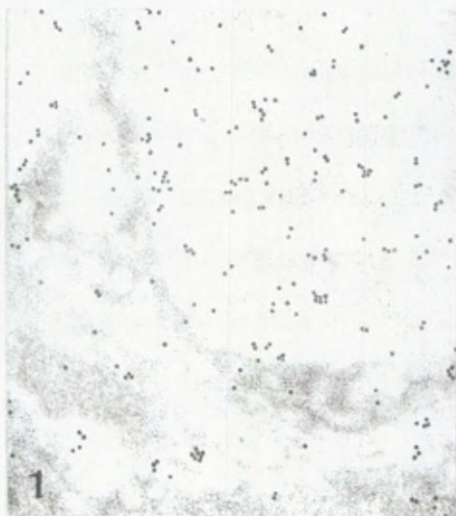


Fig.1. Célula mucosa. LFA-Fetuin-oro. Las cisternas trans del aparato de Golgi y los gránulos de secreción son intensamente marcados. x60.000.

Fig. 2. Célula serosa. ConA-Peroxi-dasa-oro. Los gránulos de secreción son reactivos. x60.000.

CARACTERIZACION HISTOQUIMICA ULTRAESTRUCTURAL DE RESIDUOS GLUCIDICOS EN LA MUCOSA LARINGEA HUMANA

M.T. Castells, J.F. Madrid, J.A. Martínez-Menárguez y J. Ballesta

Sección de Histología y Embriología General. Facultad de Medicina.

Murcia

Introducción:

Los residuos glucídicos de las glucoproteínas de la mucosa laríngea desempeñan importantes funciones protectoras, actúan como receptores para microorganismos previniendo infecciones respiratorias, sirven de elementos barrera e intervienen en el transporte de diversas sustancias en las vías aéreas (Kalinin et al. 1986).

Existen pocos datos sobre la localización subcelular de estas importantes macromoléculas en el epitelio de las vías aéreas de mamíferos (Plotkowski et al. 1990).

Nuestro objetivo es caracterizar histoquímicamente las glucoproteínas presentes en las glándulas serosas y mucosas de la laringe humana mediante el empleo de lectinas.

Material y Métodos:

Se obtuvieron muestras de mucosa laríngea humana procedentes de laringectomías. Para microscopía de luz, las muestras se fijaron en formol al 10% y tras su inclusión en parafina se obtuvieron secciones a las que se les aplicaron las siguientes lectinas conjugadas con peroxidasa: ConA (20 µg/ml), HPA (6 µg/ml) y WGA (6 µg/ml). Para microscopía electrónica las muestras fueron fijadas en 2% glutaraldehído e incluidas en Lowicryl K4M. Las secciones ultrafinas fueron incubadas con: ConA-HRP-oro, HPA-oro, WGA-ovomucoide-oro y LFA-fetina-oro.

Resultados y Discusión:

En las glándulas mucosas, los gránulos de secreción fueron intensamente reactivos a WGA y LFA y no reaccionaron frente a ConA y HPA. En el aparato de Golgi, WGA y LFA marcaron preferentemente las cisternas trans mientras que HPA y ConA mostraron afinidad por las cisternas cis (Fig. 1). El glucocalix de las microvellosidades apicales mostró afinidad por WGA y LFA. En las glándulas serosas, los gránulos secretorios reaccionaron con WGA y LFA (Fig. 2), mientras que sólo algunos gránulos mostraron afinidad por ConA. El retículo endoplásmico rugoso fué marcado por ConA

y algunas cisternas del aparato de Golgi fueron reactivas a HPA, WGA y LFA. El glucocalix de las microvellosidades apicales fué marcado por WGA y LFA. Tanto en las glándulas mucosas como en las serosas la superficie de las interdigitaciones laterales mostró afinidad por LFA.

La reacción de HPA en las cisternas cis del aparato de Golgi indica la adición de N-acetilgalactosamina en los primeros pasos de la O-glucosilación (Madrid et al. 1990). Este resultado demuestra una síntesis de O-glucoproteínas en las células mucosas y serosas. Además la reacción de ConA en el retículo endoplásmico se podría corresponder con la síntesis de N-glucoproteínas en las células serosas.

Los presentes resultados indican que mientras las glándulas mucosas contienen principalmente O-glucoproteínas, las glándulas serosas probablemente sintetizan N- y O-glucoproteínas.

Bibliografía:

- Kaliner M., Shelhamer J.H., Borson B., Nadel J., Patow C., Marom Z. (1986): Human respiratory mucosa. *Am. Rev. Respir. Dis.* 134, 612.
- Madrid J.F., Ballesta J., Castells M.T., Hernández F. (1990): Glycoconjugate distribution in the human fundic mucosa revealed by lectin- and glycoprotein-gold cytochemistry. *Histochemistry* (in press).
- Plotkowski M.C., Girod-Vaquez S., Hinnrasky J., Fuchey C., Ploton D., Puchelle E. (1990): Ultrastructural comparative distribution of carbohydrates in human tracheal and frog palate mucosa using neuraminidase and lectin-colloidal gold complexes. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 22, 79.

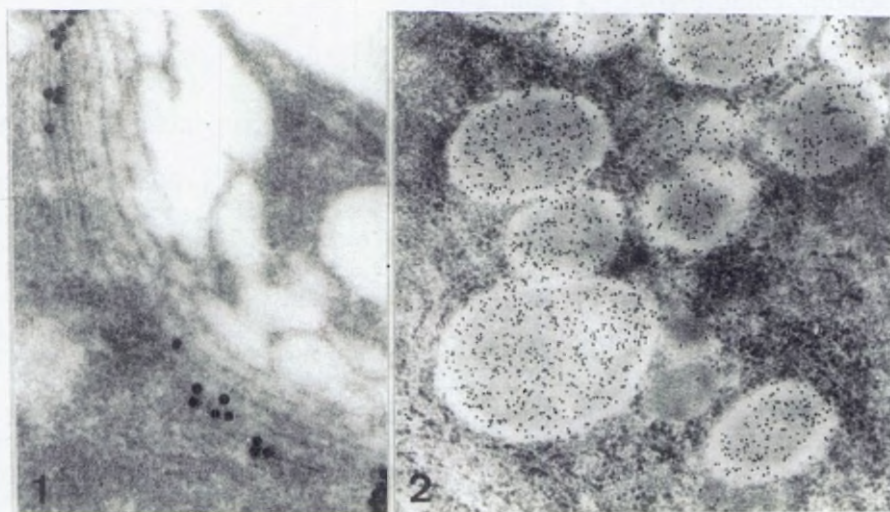


Fig. 1. Glándula mucosa. HPA. Esta lectina se une a las cisternas cis del aparato de Golgi. X67.000.

Fig. 2. Glándula serosa. WGA. Los gránulos de secreción son intensamente marcados. X30.000.

Comparación del test de Crump y Danks con una técnica original basada en el estudio ultraestructural de los poros sudoríparos con SEM.

CASTILLA, M.A.; PADRON, J.J.; CALAP, J.; PERIS, J.

Medicina (Dermatología)

Facultad de Medicina. Universidad de Cádiz.

Introducción: En la clínica dermatológica existen procesos que cursan con hiperhidrosis, con hipohidrosis o con anhidrosis.

Crump y Danks (1) idearon un test con el objeto de visualizar los poros sudoríparos con un microscopio óptico.

En el presente trabajo hemos realizado un estudio comparativo del test de Crump y Danks con una técnica original basada en el estudio ultraestructural de los poros sudoríparos con SEM.

Material y Métodos:

Para realizar el test de Crump y Danks hemos aplicado una fina película de una mezcla de acetato de celulosa al 2% y una solución de cresil violeta, en el pulpejo del dedo de 10 enfermos con diversas dermatosis (3 eczemas de contacto, 2 dermatitis atópica, 1 caso de enfermedad de Darier, 1 caso de síndrome de Siemens, 3 casos de hiperhidrosis idiopáticas y a 2 personas controles. Los resultados se han comparado con nuestra técnica (2), con un ME, SEM JEOL JSM 820.

Resultados y Discusión:

I) Tanto en los eczemas de contacto como en la atopia no hemos encontrado ninguna alteración ni en el número de poros sudoríparos ni en su morfología.

II) En la enfermedad de Darier encontramos una disminución discreta en el número de poros.

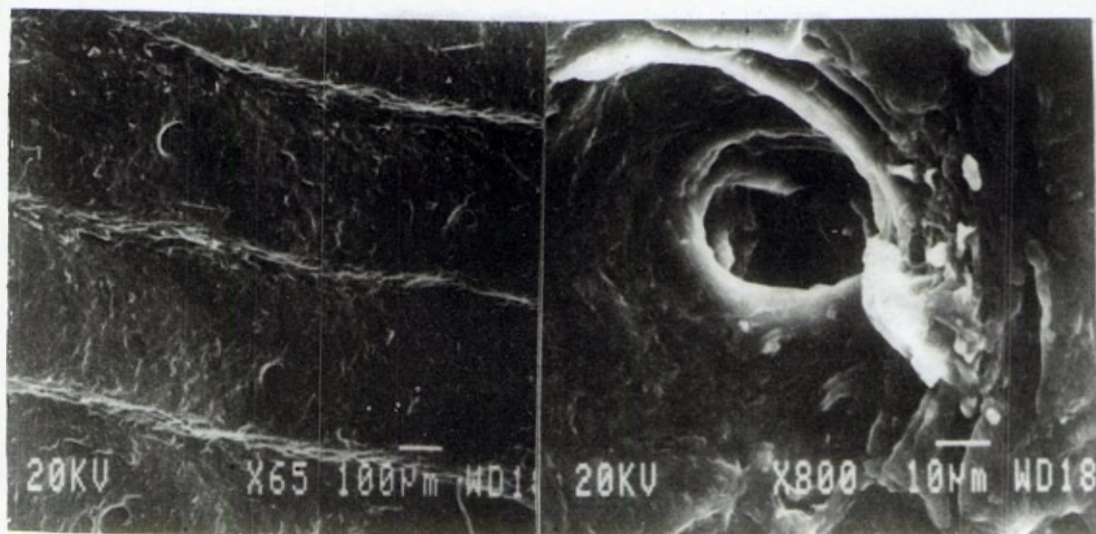
III) En un caso de síndrome de Siemens se observó una ausencia total de los poros sudoríparos que fué confirmado con la biopsia.

Comentario: En 1974 en la VI Reunión de la SEME (Salamanca) propusimos una técnica para el estudio de los poros sudoríparos consistente en la realización de una "viruta" epidérmica con una hoja de bisturí, con desplazamiento tangencial casi paralelo a la superficie de la piel, con un ángulo de inclinación muy pequeño. Este fragmento epidérmico recubierto de oro y visto al ME SEM, permite la visualización

a 65 aumentos de unos 25 a 30 poros sudoríparas por cada fragmento. Dado que el diagnóstico del síndrome de Siemens se basa en la comprobación de la ausencia de las glándulas sudoríparas y teniendo en cuenta que algunos padres han rechazado la biopsia, nos parece de interés el test de Crump y Danks, o bien la alternativa propuesta por nosotros (2) ya que en ninguno de estos casos es necesario realizar una biopsia.

Bibliografía

1. CRUMP, I.A. y DANKS, D.M. Hypohidrotic ectodermal dysplasia. A study of sweat pores in the X linked form in a Family with probable autosomal recessive inheritance. J. Pediat. 78, 466-473 (1971).
2. CALAP, J., BRINES, J., ESCRIBANO, A., MASCARO, J.M. y J. COLOMER. Técnica sencilla para el diagnóstico precoz de la Displasia ectodérmica hipohidrótica. Med. esp., 71, 161-165 (1974).



CELULAS SENSORIALES DEL ORGANO DE LA LINEA LATERAL DE Gambusia affinis. ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL PRELIMINAR.

Rafael Cernuda, M^a Angeles del Brío, Ana Coto, Pedro Riera, José Manuel García Fdez.

MORFOLOGIA Y BIOLOGIA CELULAR

UNIVERSIDAD DE OVIEDO.

Introducción: La piel de ciclóstomos, peces y anfibios presenta un sistema sensorial superficial denominado órgano de la línea lateral, sensible a movimientos y estímulos vibratorios del medio circundante. Este órgano está constituido por corpúsculos sensoriales denominados neuromastos (Wright, 1885) distribuidos por toda la superficie del animal y que constan de células sensoriales y células accesorias. Debido a sus semejanzas en ultraestructura, desarrollo y filogenia con el oído interno de vertebrados se le agrupa con éste como el sistema "acústico-lateralis". El objetivo de nuestro estudio fue la ultraest. de las cél. sens.

Material y Métodos: Se han utilizado individuos adultos de la especie Gambusia affinis. Una vez anestesiados con MS-222, fueron fijados por inmersión en glutaraldehído 5% en tampón fosfato 0.1M y pH 7.4, durante 2 horas a temp. amb. Posteriormente se extrajeron los neuromastos por disección y se realizó una postfijación en tetróxido de osmio 1%. Tras una deshidratación en acetona, se incluyó el material en resina Epon. Las secciones ultrafinas se obtuvieron con un ultramicrotomo Reichert-Jung Ultracut y se montaron en rejillas de cobre. Una vez contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo, las muestras fueron observadas en un microscopio electrónico Jeol 2000 EXII.

Resultados y Discusión: Las células sensoriales presentan una morfología piriforme y un citoplasma electrón-denso. En el ápice aparece un paquete de estereocilios y 1 único cinetocilio (9+2) que confieren una polaridad apical a la célula, ligada a su funcionamiento (Flock y Wersäll, 1962; Flock, 1965, etc). En esta zona se establece una fuerte unión a las células de soporte vecinas mediante un complejo de unión. Estas células vecinas parecen jugar también un papel de aislamiento (Hama, 1965).

Se puede observar un ap. de Golgi desarrollado, escasas cisternas de R.E.R., abundante R.E.L., cuerpos multivesiculares y una red de microtúbulos orientada según el eje longitudinal.

Tal vez la característica más interesante sea la presencia de unas inclusiones densas de aspecto granular, que se sitúan tanto dentro del núcleo (fig. 1) como en el citoplasma.

Inclusiones similares ya han sido descritas en otras especies de Teleósteos y anfibios (Yamada y Hama, 1972, etc), pero su naturaleza y significado es aún desconocida. Tweedle (1977) los considera una etapa en el desarrollo de los cuerpos sinápticos. La presencia intranuclear de estas inclusiones observada en G. affinis parece invalidar esta teoría.

En la porción basal se observa un acúmulo importante de vesículas, que aparecen asociadas a las sinapsis aferentes. Este tipo de sinapsis presenta un cuerpo presináptico denso de morfología variable. En algunas ocasiones, también se observan una serie de densificaciones adosadas a la membrana presináptica, así como un ligero engrosamiento de la membrana postsináptica (fig. 2). Estas estructuras ya han sido observadas en otras especies (Ekström von Lubitz, 1981, etc) pero su significado está poco claro. También se observa un segundo tipo de sinapsis o sinapsis eferente caracterizada por presentar terminales de gran tamaño cargados de vesículas y un aparato subsináptico representado por una cisterna aplanada paralela a la membrana postsináptica (fig. 3) también observado en otras especies (Blaxter, 1987).

- Bibliografía:** -BLAXTER, J.H.S. (1987). Structure and development of the lateral line. Biol Rev 62: 471-514.
 -EKSTROM VON LUBITZ, D.J.K. (1981). Ultrastructure of the lateral line sense organs of the ratfish, Chimaera Monstrosa. Cell Tissue Res. 215: 651-665.
 -FLOCK, A. y WERSALL, J. (1962). Synaptic structures in the lateral line organ of the teleost fish Lota vulgaris. J. Cell Biol. /13:337-344.
 -HAMA, K. (1965) Some observations on the Fine Structure of the Lat. Line Organ of the Japanese sea eel. J.C.B. 24:193

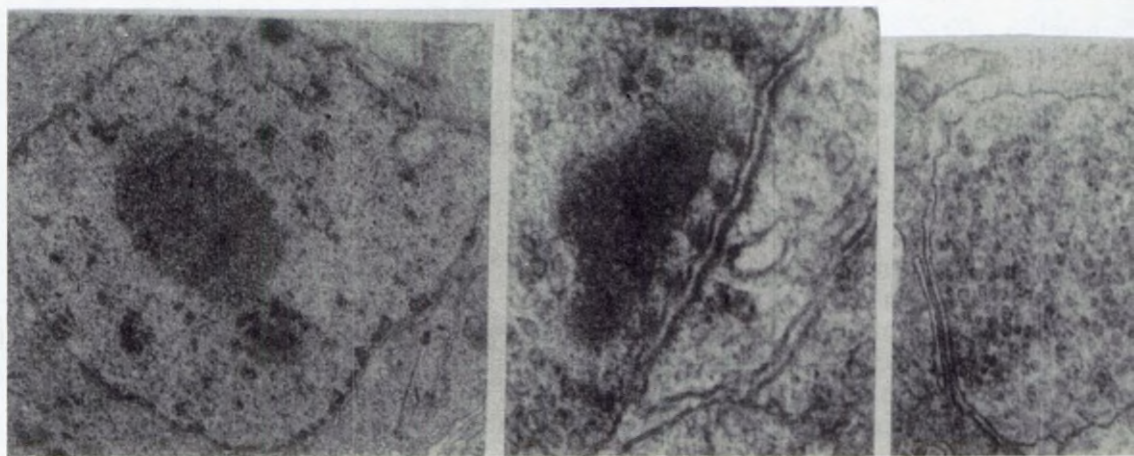


Fig.1.-X12000

Fig.2.-X65000

Fig.3.-X40000

LOCALIZACION DE GLUCOCONJUGADOS EN ESPERMATOZOIDES DE HAMSTER EN EL EPIDIDIMO: ESTUDIO CON LECTINAS.'

N. Cortadellas y J. Garcia. **Valero.**

Serv. Científico - Técnicos y Unidad de Biología Celular.

Universidad de Barcelona.

Introducción:

En los mamíferos, el reconocimiento entre los gametos se produce por mediación de glucoproteínas presentes en la superficie del óvulo y del espermatozoide (Fraser y Ahuja, 1988). Generalmente los espermatozoides de las regiones proximales del epidídimo son incapaces de reconocer al óvulo y fertilizarlo (Orgebint-Crist y col., 1972). En el hamster esta capacidad se adquiere en la región proximal del cauda (Horan y Bedford, 1972), y se encuentra relacionada, como en muchas otras especies, con distintos cambios bioquímicos del espermatozoide (proceso de maduración del espermatozoide).

Material y Métodos:

Muestras del caput y cauda del epidídimo se fijaron en 4% paraformaldehído - 0.1% glutaraldehído en PBS (0.1 M, pH 7.4), durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron las incubaciones con diversas lectinas (Con A, WGA, PNA, UEA-I, DBA) marcadas con oro coloidal de 16 nm. Las observaciones con microscopía óptica se llevaron a cabo previa amplificación con plata (Intense M, Ranssens); con T.E.M., se realizó un estudio "in toto" del espermatozoide.

Resultados y Discusión:

La distribución de marcaje con las distintas lectinas utilizadas se observó principalmente en la cabeza del espermatozoide y más concretamente en el acrosoma, excepto en el caso de la WGA, que se obtuvo marcaje en el flagelo con espermatozoides del cauda epididimal.

Los resultados demuestran que para cada uno de los receptores estudiados, se presentan patrones de distribución característicos y que varían para un mismo receptor entre espermatozoides pertenecientes al caput y cauda del epidídimo.

Estas modificaciones, observadas también en otras especies como el toro, conejo, ratón, chimpancé (Friess, 1984; Delpech, 1988; Koehler, 1978; Young, 1986) se consideran como parte del proceso de maduración, por el cual el espermatozoide adquiere su capacidad para fertilizar al óvulo.

En la membrana, los cambios son probablemente el resultado de la interacción del espermatozoide con el medio epididimal (Friess, 1984):

- Degradación de glucoproteínas por proteasas o alteración de los oligosacáridos por glucosidasas.
- Absorción de substancias del medio epididimal que emmascaren los receptores.

El significado funcional de estas modificaciones, no se conoce, pero probablemente estén relacionadas con los mecanismos de reconocimiento óvulo - espermatozoide.

Segmento apical(SA), S principal(SP), S equatorial(SE).

Fig.1. M.O. Con A, espermatozoides de la región del caput. Marcaje del SA, SP y SE. (x 250).

Fig.2. M.O. Con A, espermatozoides de la región del cauda. Marcaje del SA, SP y flagelo. (x 450).

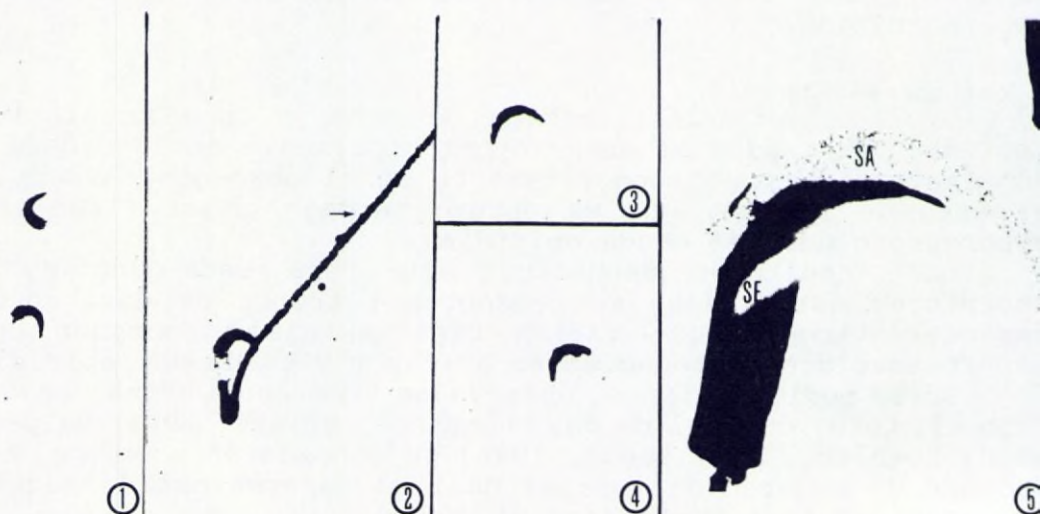
Fig.3. M.O. UEA-I, cauda. Marcaje del SA. (x 550).

Fig.4. M.O. WGA, caput. Marcaje del SA y SP. (x 500).

Fig.5. M.E.T. WGA, región del caput. Observese el marcaje del SA y SP del acrosoma. Notese la correspondencia con la imagen de la Fig.4.

Bibliografía:

- KOEHLER J.K.(1981): Archives of Andrology, 6, 197-217.
 LEE S.H. and AHUJA K.K.(1987): J. Reprod. Fert. 80, 65-74
 YOUNG L.G., GOULD K.G. and HINTON B.T.(1986): Gamete Res. 14:75-87
 DELPECH S. et al. (1989). J.Exp.Zoology 245: 59-62.
 FRIESS A.E. and SINOWATZ F. (1984): Biol.Cell, 50:279-284.



PATRONES MICROSCOPICOS MICROVELLOSITARIOS DE LA VELLOSIDAD INTESTINAL.

Crespo, PV., Campos, A.

Departamento de Histología y Biología Celular. Facultad de Medicina. Universidad de Granada. 18071 Granada.

Introducción:

El estudio de la población celular que reviste la superficie intestinal constituye uno de los objetivos básicos para el conocimiento biopatológico de la malabsorción intestinal (1, 2). En este sentido, realizamos un estudio postnatal cuantitativo experimental en rata con microscopía electrónica de barrido de la densidad microvellositaria a lo largo de la vellosidad intestinal del ileón en las zonas Z_{MV} , Z_{FV} y Z_D .

Material y Métodos:

Para dicho estudio hemos utilizado 15 ratas Wistar que sacrificamos en los periodos de recién nacido, de 80 días y de 160 días de edad. Las muestras fueron procesadas para microscopía electrónica de barrido según la pauta metodológica descrita en trabajos previos (3), y fueron analizados en un microscopio electrónico de barrido Philips 505, realizándose posteriormente un estudio morfométrico y un análisis estadístico.

Resultados y Discusión:

Nuestros resultados revelan que los patrones de densidad microvellositaria a nivel del ileón presentan variaciones significativas en las tres zonas estudiadas a lo largo de la vellosidad. Existiendo una disminución progresiva de la densidad microvellositaria desde Z_{MV} , Z_{FV} y Z_D . Dicho fenómeno es repetitivo en cada una de las etapas analizadas. Por otra parte, destaca el hecho de que la densidad microvellositaria alcanza los valores más altos a nivel de la Z_{MV} de RN (46,19) y de 160 días (47,97) y mínimos a nivel de la Z_D de 80 días (15,97) como se señalan en las figuras nº 1, 2 y 3. La interpretación de estos datos resulta sumamente compleja. En principio puede probarse que la densidad microvellositaria parece estar en alguna medida relacionada con los modelos de renovación celular propuesta para el epitelio intestinal en dicho período. Por último, debemos señalar al igual que Clarke (4), que los cambios

existentes en el desarrollo postnatal se relacionan con factores nerviosos, hormonales y evidentemente nutritivos y sugieren una más profunda investigación.

Bibliografía

- 1)Poley, J.R. (1983). SEM III: 1293.
- 2)Motta, P.M. y Fujita, H. (1988). Martinus Nijhoff Publishing. Boston.
- 3)Crespo, P.V. y cols. (1989). Histol. Med. 5:69.
- 4)Clarke, R.M. (1972). J. Anat. 112:27.

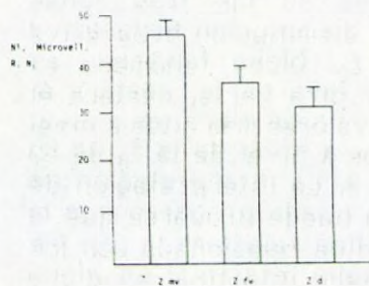


Figura nº 1

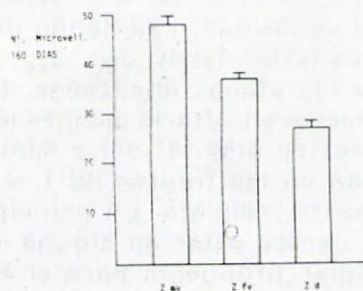


Figura nº 2

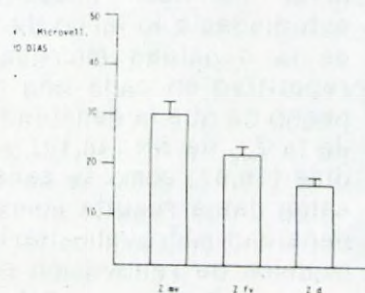


Figura nº 3

INVASION POR MACROFAGOS DEL AREA DE MUERTE CELULAR EN LA VESICULA DEL CRISTALINO DEL EMBRION DE POLLO DURANTE SU DESPRENDIMIENTO DEL ECTODERMO: ESTUDIO A MICROSCOPIA ELECTRONICA E INMUNOCITOQUIMICO.

M.A. Cuadros¹, C. Martín², G. Martín-Partido³, A. Ríos¹, J. Navascués¹

¹ Dpto. Biología Celular, Fac. Ciencias, Univ. Granada, Granada.

² Institut d'Embryologie Cellulaire et Moléculaire, CNRS, Nogent-sur-Marne, France.

³ Dpto. Ciencias Morfológicas y Biología Celular y Animal, Fac. Ciencias, Univ. Extremadura, Badajoz.

Introducción: Durante el cierre de la vesícula del cristalino del embrión de pollo, su epitelio muestra un área de muerte celular. Las células fagocíticas libres asociadas a la misma habían sido interpretadas en la literatura como derivadas del epitelio de la vesícula del cristalino (García-Porrero et al., 1984). Con objeto de comprobar su origen, hemos analizado estas células en embriones de pollo con microscopía electrónica de barrido y transmisión y con tinción histoquímica para la fosfatasa ácida, y en quimeras pollo-codorniz de saco vitelino, mediante tinción inmunocitoquímica con el anticuerpo monoclonal MB-1. Dicho anticuerpo revela la expresión de un antígeno de superficie específico de células endoteliales y células hematopoyéticas de codorniz (Péault et al., 1983).

Material y Métodos: Los embriones de pollo utilizados estaban comprendidos entre los estadios 14 y 24 de Hamburger y Hamilton (HH14-HH24). Para microscopía electrónica de barrido y transmisión se utilizó la metodología de rutina (Martín-Partido y Navascués, 1990). La detección histoquímica de la actividad fosfatasa ácida se llevó a cabo mediante la técnica de Burstone (Higuchi et al., 1979), que utiliza fosfato de naftol como sustrato. Las quimeras pollo-codorniz de saco vitelino se consiguieron sustituyendo el área central del blastodermo de un embrión de codorniz de 7-11 somitas por una región equivalente de un embrión de pollo de desarrollo similar (Martín, 1972). Estas quimeras se trataron con el anticuerpo MB-1 (Péault et al., 1983), que fue revelado mediante el complejo biotina-estreptavidina-peroxidasa.

Resultados y Discusión: Nuestros resultados han revelado que en el espacio entre el ectodermo y la vesícula del cristalino comienzan a aparecer células libres de contornos redondeados y aspecto ameboide en el estadio HH16, siendo muy numerosas en HH17. En este estadio del desarrollo se observan rodeando al tallo del cristalino (Fig. 1). En secciones semifinas, el citoplasma de estas células muestra numerosos fragmentos picnóticos, lo que demuestra su actividad fagocítica. Con microscopía electrónica de transmisión, los rasgos morfológicos más característicos de las células fagocíticas libres asociadas a la vesícula del cristalino consiste en la presencia de un núcleo de contornos irregulares, con una fina banda de heterocromatina bajo la envoltura nuclear, y un citoplasma con numerosas vacuolas digestivas, mitocondrias de matriz clara y escasas cisternas de retículo endoplasmático. Estos caracteres coinciden con los mostrados por macrófagos que invaden otros tejidos embrionarios (Cuadros, 1986; Martín-Partido y Navascués, 1990), sugiriendo que

las células libres asociadas a la vesícula del cristalino durante su cierre y desprendimiento del ectodermo son macrófagos.

Esta posibilidad ha sido confirmada por los resultados obtenidos con técnicas histoquímicas e inmunocitoquímicas. En efecto, a diferencia de las células epiteliales que fagocitan restos celulares, los fagocitos libres en el espacio entre el ectodermo y el epitelio del cristalino exhiben una intensa actividad fosfatasa ácida, como es típico de macrófagos. Además, en quimeras pollo-codorniz de saco vitelino, los fagocitos libres son MB-1 positivos (Fig. 2), permitiendo concluir que proceden de células de línea hemangioblástica que se han originado en el área vascular extraembrionaria en estadios posteriores a la operación quirúrgica para la obtención de la quimera (estadios HH9-11). La procedencia hemangioblástica de estas células está de acuerdo con su naturaleza macrofágica y descarta su procedencia del epitelio del cristalino.

Tanto en el mesénquima adyacente a la copa óptica como en los bordes de la misma se observan células ameboides, que presentan actividad fosfatasa ácida y son MB-1 positivas, lo que sugiere que los macrófagos asociados a la vesícula del cristalino migran desde el mesénquima que rodea al esbozo ocular.

En el espacio entre el ectodermo y la vesícula del cristalino, los macrófagos eliminan restos de células muertas, contribuyendo así a la total desaparición del área de muerte celular que participa en el cierre de la vesícula del cristalino.

Bibliografía

- Cuadros MA (1986) Tesis Doctoral. Univ. Granada.
García-Porrero JA, Colvée E, Ojeda JL (1984) *Anat. Rec.* 208:123
Higuchi S, Suga M, Dannenberg AM, Schofield BH (1979) *Stain Technol.* 54:5
Martin C (1972) *Compt. Rend. Séances Soc. Biol. (Paris)* 166:283
Martín-Partido G, Navascués J (1990) *J. Neurocytol.* 19:820
Péault BM, Thiery JP, LeDouarin NM (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2976

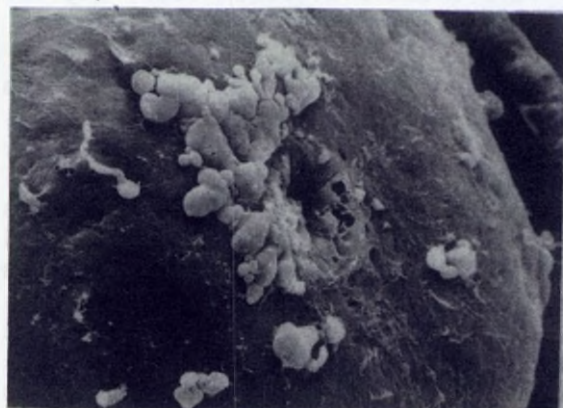


Fig. 1: Microscopía electrónica de barrido de la vesícula del cristalino de un embrión de pollo de HH17, después de eliminar el ectodermo que la cubre. Se observan numerosas células libres sobre su superficie.



Fig. 2: Sección coronal de la vesícula del cristalino de una quimera pollo-codorniz de HH19, tratada inmunocitoquímicamente para poner de manifiesto las células que expresan el antígeno MB-1.

SONDAS MONOCLONALES EN EL MAPEO ANTIGENICO DE LA INFECCION NATURAL POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

Cuevas L., Santa María I., Herrera M.I., Sánchez-Alonso F.* y Nájera R.

Servicio de Microscopía Electrónica
Centro Nacional de Biología Celular y Retrovirus. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda (Madrid). *Hospital Clínico S. Carlos (Madrid).

Introducción: Todavía existen diversas incógnitas en el conocimiento de la infección natural por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). Tras un primer encuentro con el virus, la persona puede sufrir una infección silente, antes de desarrollar anticuerpos. Por otra parte, las personas seropositivas pueden permanecer sanas durante largos períodos. Una importante variable a estudiar es la sensibilidad de la célula huésped a la replicación del virus, medida, p. ej., por la expresión de antígenos "in vivo" en los individuos infectados, o por períodos de viremia (primordial por sus implicaciones en la patología y transmisión del virus), constituyendo el objetivo de nuestro estudio, en el que se combina la Inmunomicroscopía Electrónica de Barrido con sondas monoclonales marcadas con oro coloidal para la detección de antígenos de VIH, por sus ventajas (1), con otras técnicas virológicas.

Material y Métodos: Se han estudiado muestras de células mononucleares de sangre periférica (PBMc) de dos grupos diferentes de personas: A) 20 seropositivos asintomáticos (grupo CDCII), adictos a drogas por vía parenteral (ADVP); B) 24 mujeres con sospecha de riesgo para SIDA (13 con condilomas y/o papilomas genitales, 3 con neoplasia intraepitelial de cérvix, 2 con enfermedad inflamatoria pélvica, 2 ADVP y con enfermedad de transmisión sexual, 2 con posible transmisión percutánea o parenteral, 1 con salpingitis y 1 pareja de un caso con SIDA). Técnicas: grupo A) M.E. y serología; grupo B) M.E., serología, aislamiento y PCR. Mapeo antigénico con anticuerpos monoclonales anti-p24 y anti-gp41 (anticuerpos primarios), e Igs de cabra anti-IgG de ratón ligadas a oro coloidal de 30 nm (anticuerpos secundarios). El estudio se realizó utilizando un microscopio electrónico TEM/STEM (modo SEM, a 120 kv) con detectores de electrones secundarios y de retrodispersados.

Resultados y Discusión:

GRUPO A): El porcentaje total de casos positivos por Inmunomicroscopía Electrónica de Barrido fue del 30% (6/20). Los casos positivos se distribuyeron así: 15% (3/20) fueron positivos tanto para p24 como para gp41; 5% (1/20) fueron positivos sólo para p24, y 10% (2/20) fueron positivos sólo para gp41.

El porcentaje del 30% es similar al en contrado por algunos autores en estudios de individuos del grupo CDCII que fueron positivas por aislamiento en plasma (2) o expresaban antígeno p24 en células mononucleares de sangre periférica mediante citometría de flujo (3).

GRUPO B): a) Se encontró una infección abierta (presencia de anticuerpos) en 3 casos (12.5%): 2 ADVP (1 con enfermedad inflamatoria pélvica, 1 con frecuentes abortos) y 1 caso cuya pareja tenía SIDA.

b) Se obtuvieron resultados serológicos indeterminados (EIAs sin confirmar) en 3 casos (12.5%): 1 ADVP con frecuentes abortos, 1 caso de salpingitis, 1 caso de condilomas.

c) Otros 3 casos (12.5%) fueron compatibles con posibles infecciones silentes (ausencia o no confirmación de anticuerpos; aislamiento del virus en plasma y/o Inmunomicroscopía Electrónica positiva): 1 ADVP con frecuentes abortos, 1 con enfermedad inflamatoria pélvica y 1 con condilomas.

Estos datos pueden indicar que el riesgo de infección por VIH en adictos a drogas por vía parenteral se ve incrementado en aquellos que tienen, además, enfermedades de transmisión sexual. También parece ser un factor de riesgo, para contraer la infección por VIH, la enfermedad infecciosa pélvica, uno de cuyos factores de predisposición es la promiscuidad sexual, y que puede ocurrir por diseminación linfática o hematogena de la infección del tracto genital inferior.

La asociación de lesiones genitales con la infección por VIH necesita una mayor profundización mediante métodos óptimos de detección y estudios de seguimiento. En este sentido, la Inmunomicroscopía Electrónica de Barrido utilizando anticuerpos monoclonales, oro coloidal y un detector de electrones retrodispersados (Fig. 1), aporta una serie de ventajas como su especificidad, sensibilidad y rapidez, que la hacen especialmente indicada para el estudio "in vivo" de infecciones, como la del VIH, en las que pueden existir períodos crípticos o de replicación incompleta con bajos niveles de expresión antigénica, donde otras técnicas tienen sus limitaciones.

Bibliografía:

1. Herrera M.I. y Nájera R. Immunolectron Microscopy in AIDS Diagnosis. En Tumor Diagnosis by Electron Microscopy. Russo J. and Sommers S.C. (Eds.) Field & Wood. New York, 1990, pp. 315-346.
2. Coombs RW, Collier AC, Alain JP et al. Plasma viremia in human immunodeficiency virus infection. N Engl J Med 1989; 321: 1626-31.
3. Mc Sharry JJ and Lehman JM. Quantitation of human immunodeficiency virus in the blood. N Engl J. Med 1990; 322: 1466.

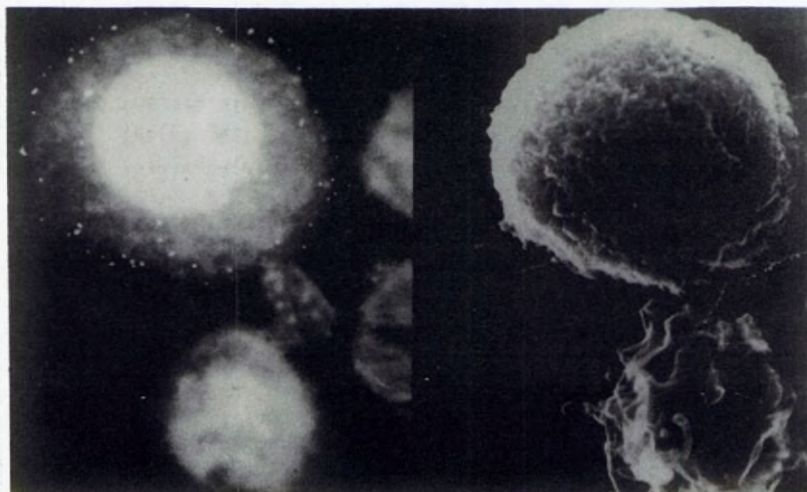


Fig.1. Micrografía de doble (MEB-e.retrodispersados/MEB-e.secundarios) de dos linfocitos, uno de ellos infectado por VIH (MEB-e.retrodispersados, a la izquierda), mostrando morfología alterada. El linfocito normal no presenta marcado.

TIPOS DE TANICITOS EN EL HIPOTALAMO MEDIO DEL CONEJO (*Oryctolagus cuniculus*)

M^a Angeles del Brío; Pedro Riera; Jose Manuel García;
Rafael Cernuda; Ana Coto.

Morfología y Biología Celular

Universidad de Oviedo

Introducción:

Se ha realizado el estudio óptico y ultraestructural con microscopía electrónica de transmisión y barrido, de los tipos de tanicitos que se encuentran en el epéndimo que tapiza la pared del tercer ventrículo, a nivel del hipotálamo medio en el conejo (*Oryctolagus cuniculus*). Se describen cuatro tipos diferentes de tanicitos, según su morfología y localización.

Material y Métodos: Se utilizaron 16 conejos, machos adultos, de aproximadamente 3 Kg. de peso, distribuidos en 2 grupos de 8, para los estudios de MET y MES. Todos fueron anestesiados con pentobarbital (40 mgr./Kg.) y tras la administración de heparina, perfundidos por vía cardíaca. El fijador utilizado fue 1% paraformaldehído-5% glutaraldehído, tanto para MET como MES.

Los cortes semifinos para MO, teñidos con azul de toluidina se fotografiaron en un fotomicroscopio Zeiss. Los cortes ultrafinos para MET se observaron en un Zeiss EM-109. Las muestras para MES, fueron observadas en un Philips SEM-500.

Resultados y Discusión:

Tanicitos tipo I.- Con morfología alargada y proceso basal ramificado en el neurópilo subyacente. En su polo apical muestran microvellosidades. Ubicados en la zona dorsal del hipotálamo medio, a nivel del núcleo dorsomedial. Equivalen a los tanicitos dorsales de Millhouse y de Card y Rafols, y al tipo 1 de Sharp.

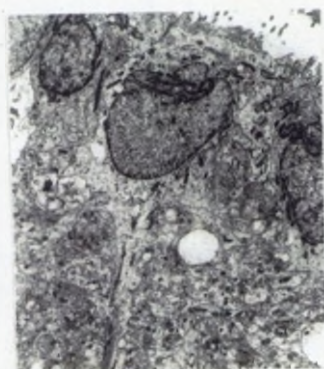
Tanicitos tipo II.- Aparecen agrupados y con morfología alargada; su proceso basal no está ramificado. En el polo apical muestra escasas microvellosidades. Se encuentran a nivel del núcleo ventromedial del hipotálamo. Equivalen a los tanicitos de transición de Millhouse, a los alfa-1 de Akmayev y a los del NVM de Walsh.

Tanicitos tipo III.- Forman la línea endimaria que recubre el área del núcleo arcuato. De morfología alargada, la prolongación introduciéndose en el neuropilo se relaciona con neuronas y vasos de la zona. El polo apical presenta numerosas proyecciones, pequeñas. Este mismo tipo se encuentra tapizando el recesso lateral de la eminencia media. Equivalen a los tanicitos de transición de Millhouse, a los tipos 2 y 3 de Sharp, a los alfa-2 y beta-1 de Akmayev, a los ventrales de Card y Rafols, a los del núcleo arcuato de Walsh y a los beta-1 de Rodríguez

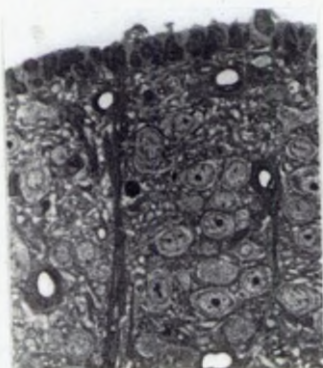
Tanicitos tipo IV.- Situados en la zona central de la eminencia media, su polo apical presenta una superficie lisa o con alguna proyección amplia y ocasionalmente algún cilio. Su prolongación basal acaba en un pie terminal que contacta con los vasos fenestrados del sistema porta-hipofisario. Equivalen a los tanicitos ventrales de Millhouse, a los tipo 4 de Sharp, a los beta-2 de Akmayev, a los ventrales de Card y Rafols y a los beta-1 ventrales de Rodríguez.

Bibliografía

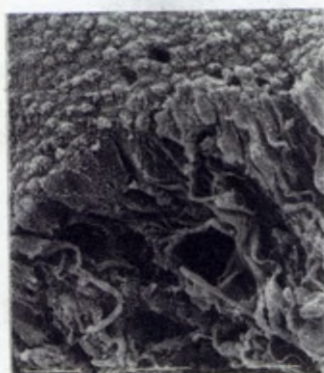
- AKMAYEV, I.G. y FIDELINA, O.V. (1976). Cell Tissue Res. 173; 457-467.
 CARD, J.D. y RAFOLS, J.A. (1978). Amer. J. Anat. 151; 173-190.
 MILLHOUSE, O.E. (1971). Z. Zellforsch. 121; 1-13.
 RODRIGUEZ, E.M.; GONZALEZ, C.B. y DELLANOY, L. (1979) Cell Tissue Res. 201; 377-408.
 SHARP, P.J. (1972). Z. Zellforsch. 127; 552-569.
 WALSH, R.J.; BRAWER, J.R. y LIN, P.S. (1978). Amer. J. Anat. 151; 377-408.



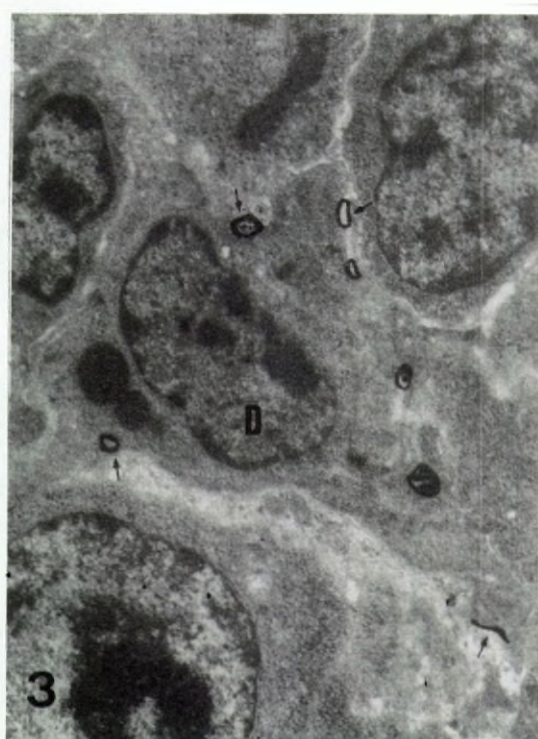
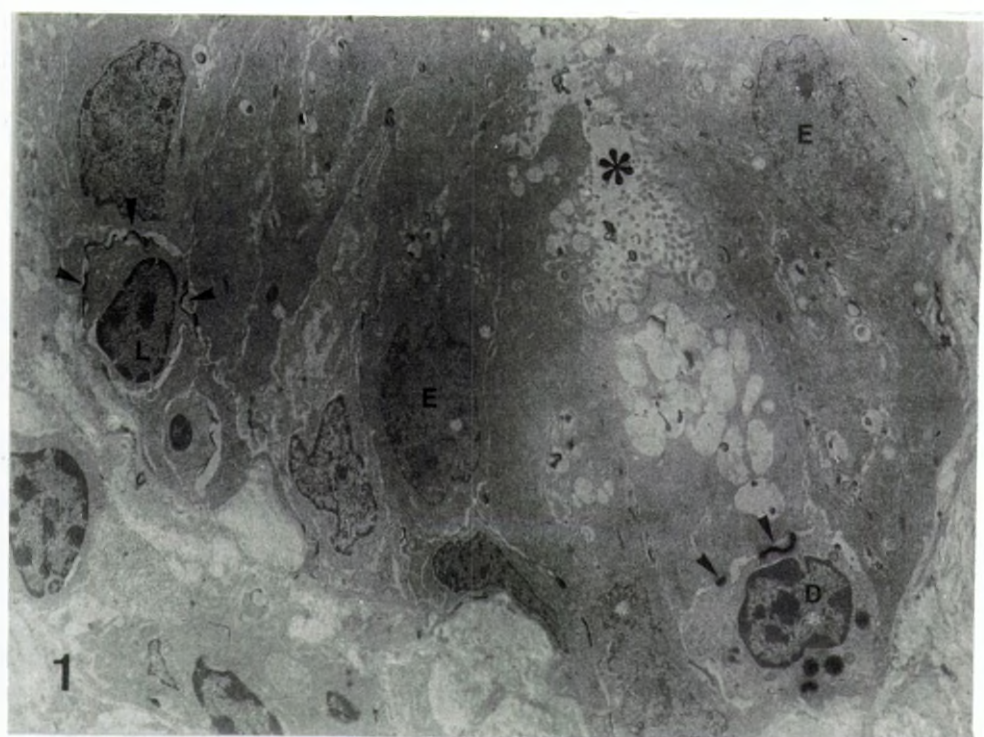
Tipo I; MET, x5250



Tipo III; MO, x400



Tipo III; MES, x3125



LINFOCITOS INTRAEPITELIALES: POSIBLE ORIGEN DE CELULAS DENDRITICAS EN AVES

DEL CACHO E, GALLEGO M, BARBERAN M, ARNAL C, BASCUAS JA

Dpto. Patología Animal.

Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. Zaragoza

Introducción: Los linfocitos intraepiteliales (LIE) constituyen una población especial de células, localizadas entre células epiteliales, que presentan en las aves marcadores de superficie peculiares (1). Se ha propuesto que podrían participar en la modulación de la expresión del antígeno de superficie Ia en células epiteliales (2) y en la regulación de la respuesta inmunitaria local que se desencadena a nivel de las mucosas (3). Se ha sugerido, asimismo, que los LIE podrían transportar antígeno (4).

En el presente trabajo se estudia la capacidad de los LIE para actuar como células transportadoras de antígeno en la glándula de Harder del pollo. Se ha seleccionado un antígeno soluble de naturaleza proteica, peroxidasa de rábano (HRP), que permite seguir mediante microscopía electrónica su evolución en el curso de la respuesta inmunitaria que se desencadena a nivel local.

Material y Métodos: Se han utilizado pollos White Leghorn de 7 semanas de edad. A 12 de ellos se les inyectó en el tercer párpado 0.02 ml de HRP al 2% en solución salina fisiológica estéril (SSFE). A 3 animales testigo se les inyectaron 0.02 ml de SSFE y otras 3 aves se mantuvieron como controles absolutos, sin tratamiento. Los animales se sacrificaron a los 7 y 9 días postinyección. Los LIE se estudian en los conductos de la glándula de Harder, para ello, ambas glándulas de cada animal se fijaron en glutaraldehído al 1%. La peroxidasa endógena se inhibió como proponen Herzog y Miller (5), mientras que la peroxidasa exógena se puso de manifiesto mediante incubación en el medio de Graham y Karnovsky (6). Se utilizaron como controles negativos muestras de animales testigo incubadas en el mismo medio y muestras de animales inmunizados incubadas en ausencia de HRP. La postfijación se realizó en 0.05 M al 1% y la inclusión en Epon:Araldita (1:1). Los cortes ultrafinos se contrastaron únicamente con acetato de uranilo.

Resultados y Discusión: A los 7 días de la inmunización se observó actividad peroxidasa (PO) en la superficie de células localizadas entre las células epiteliales que forman la pared de los conductos secundarios, a nivel de su tercio basal. Dichas células presentaron diferentes características ultraestructurales que permitió agruparlas en tres tipos.

TIPO I. Células con características similares a las del linfocito (Fig 1).

TIPO II. Células con características intermedias entre las del linfocito y las de la célula dendrítica inmadura (Fig 1).

TIPO III. Células con características de CD madura (Fig 2). Estas células se observaron también en el tejido linfóide difuso de localización subepitelial y en centros germinativos inmaduros.

A los 9 días de la inmunización se demostró actividad peroxidasa únicamente en la superficie de las CD foliculares (Fig 3).

En las muestras utilizadas como control no se detectó actividad PO-positiva en ningún caso

Los linfocitos con actividad PO-positiva en su superficie y localizados entre las células epiteliales de la pared de los conductos secundarios corresponden a los LIE descritos en el epitelio intestinal del pollo por Bjemegoord (7). Nuestras observaciones indican que los LIE de la glándula de Harder son activados por la fijación de inmunocomplejos (HRP - anti-HRP) en la superficie. Esta actividad parece implicar la modificación de las características ultraestructurales de los linfocitos hasta alcanzar las descritas para las CD del pollo por Olah y Glick (8). El hecho de haber observado LIE con inmunocomplejos fijados a su superficie entre las células epiteliales de los conductos secundarios, así como en el tejido linfoide difuso subepitelial y en los centros germinativos inmaduros, sugiere que los LIE pueden transportar inmunocomplejos desde el mencionado epitelio hasta el tejido linfoide subepitelial. Una vez alcanzada dicha localización, podrían contribuir a crear el microambiente necesario para la formación y desarrollo de los centros germinativos.

En consecuencia, nuestros resultados sugieren que las CD de la glándula de Harder podrían originarse a partir de los LIE. Al mismo tiempo, apoyan los hallazgos de Olah y Glick (9, 10) que han sugerido que las CD de la tonsila cecal y de la bolsa de Fabricio se desarrollan a partir de linfocitos.

Subvencionado por la D.G.I.C.Y.I. Proyecto PB 86-0532

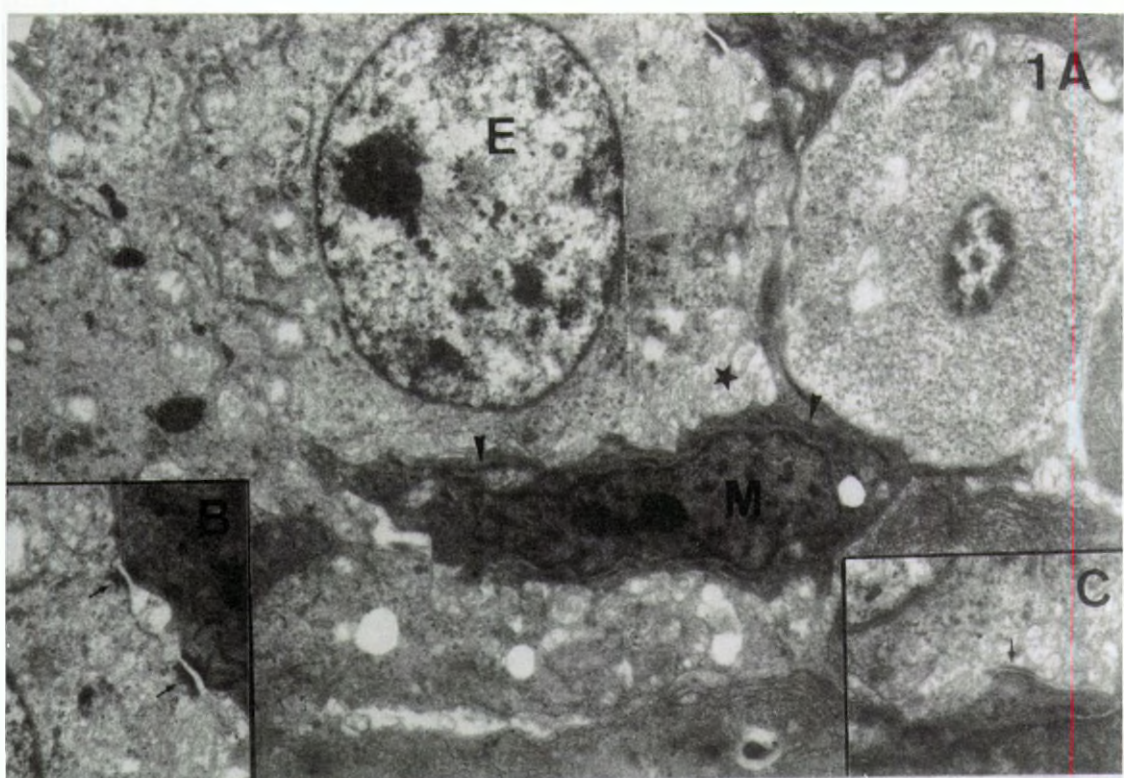
Bibliografía:

1. JEURISEN et al, 1989. Cell Tissue Res, 258:119-124
2. CERF-BENSUSSAN N. et al, 1984. J Immunol, 123:2244-2252
3. DOBBINS W, 1986. Gut, 27:972-985
4. LAWN AM, ROSE ME, 1982. J Parasitol, 68:1117-1123
5. GRAHAM RC, KARNOSKY MJ, 1966. J Histochem Cytochem, 14:291-302
6. HERZOG V, MILLER F, 1972. Histochemie, 30:235-246
7. BJEMEGAARD P, 1975. Cell Tissue Res, 161:485-495
8. OLAH I, GLICK B, 1987. Anatomical Record, 219:268-274
9. OLAH I, GLICK B, 1979. Poultry Sci, 58:195-210
10. OLAH I, GLICK B, 1981. Dev Comp Immunol, 5:639-648

Fig 1. Sección de un conducto secundario de un animal sacrificado a los 7 días de la inmunización. Célula similar a un linfocito (L) y célula dendrítica inmadura (D) ambas con actividad peroxidasa (►) en su superficie. E: Célula epitelial. *:Luz del conducto. 3.500X.

Fig 2. Sección de un conducto secundario de una animal sacrificado a los 7 días de la inmunización. Células dendríticas maduras (D) con actividad peroxidasa (►) en su superficie. 2.000X.

Fig 3. Célula dendrítica folicular (D) que presenta actividad peroxidasa (→) en su superficie. Animal sacrificado a los 9 días de la inmunización. 7.500X.



TRANSFORMACION DE CELULAS MIOEPITELIALES EN MIOFIBROBLASTOS

DEL CACHO E., GALLEGO M., BARBERAN M. y BASCUAS J.A.

Dpto. de Patología Animal.

Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza.

Introducción: El miofibroblasto (MF) es una célula con características comunes al fibroblasto (RER y complejo de Golgi desarrollados) y a la célula muscular lisa (haces de microfilamentos con zonas de condensación) (Rudolph et al, 1981). Son células de naturaleza contráctil que poseen microfilamentos de tipo actina (Gabbiani et al, 1972) y de tipo miosina, ésta última diferente a la que existe en las células musculares (Tomasek et al, 1987). El origen de los MF no se encuentra totalmente aclarado. Se ha propuesto su origen a partir de diferentes tipos de células, como el fibroblasto (Oda et al, 1988), célula endotelial y pericito (Varela et al, 1978) célula mioepitelial (Díaz Flores et al, 1979), célula muscular lisa (Abelera, 1978) y macrófago (Bhawan y Majno, 1989).

Material y Métodos: Para el presente estudio se han utilizado pollos White Legorn de 7 semanas de edad a los que se les goteó en el globo ocular 10 μ l de una suspensión de Brucella ovis reo-198 (no CO_2 dependiente) en solución salina fisiológica estéril (SSFE) (10^9 microorganismos/ml) cada 5 minutos durante media hora. A los animales testigo se les goteó SSFE siguiendo la misma pauta experimental. Los animales se sacrificaron en ambos casos, a los 30, 60 y 90 minutos de la última administración. Las correspondientes glándulas de Harder se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en tampón cacodilato durante 1 hora y se incluyeron en Araldita: Epon (1:1) (Mollenhauer, 1963), para estudiar la evolución de las células mioepiteliales que envuelven los conductos de la glándula de Harder en las aves.

Resultados y Discusión: En los animales a los que se administró la suspensión de Bucella ovis las células mioepiteliales, localizadas en torno a los conductos intraglandulares, mostraron una serie de modificaciones que se acentuaron desde los 30 a los 90 minutos, y que se resumen en las siguientes: aparición de haces de microfilamentos (50-100 A), aumento de la cantidad de RER y desarrollo del complejo de Golgi, desaparición progresiva de desmosomas entre células mioepiteliales y epiteliales, que quedan sustituidos por estructuras de unión de menor complejidad; pérdida de la membrana basal en zonas adyacentes a las células mioepiteliales en transformación y aumento del espacio intercelular entre éstas y las células epiteliales. Dicho espacio se encontró ocupado por numerosas microvellosidades que se proyectaban desde la superficie de ambos tipos de células así como por un material finamente granular.

Los resultados obtenidos apoyan el origen de los MF a partir de células

las mioepiteliales. Dicha transformación puede atribuirse a la situación de hipoxia funcional que sufren las células mioepiteliales como consecuencia de la contracción continuada a la que se ven sometidas para facilitar la expulsión de la secreción glandular, con el fin de aumentar su flujo hacia el saco conjuntival. Kischer et al. (1982) consideran la hipoxia como un factor determinante de la transformación de fibroblastos en MF, y éste puede ser también el factor que desencadene la transformación de células mioepiteliales en MF.

El hecho de que las células mioepiteliales, de origen ectodérmico, puedan transformarse en MF indica que éstas células no tienen un origen exclusivamente mesodérmico, como propusieron Ohtani y Sasano (1980). Ya que los MF pueden diferenciarse a partir de células mioepiteliales y de fibroblastos, su origen es tanto ectodérmico como mesodérmico, es decir, hojas embrionarias diferentes pueden dar lugar a un mismo tipo celular, como proponen Díaz Flores et al. (1979).

Nuestros resultados sugieren que los MF deben considerarse un estado fisiológico de ciertas estirpes celulares de origen ecto y mesodérmico y no únicamente el resultado de un proceso patológico como proponen Ohtani y Sasano (1980).

* Subvencionado por la C.I.C.Y.T. Proyecto PB86- 0532

- Bibliografía:** Abehsera, 1978. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Granada
 Bhawan y Majno, 1989. Am. J. Dermatopathol., 11: 255-258
 Díaz Flores et al., 1979. Morfología Normal y Patológica (A). 3: 63-75
 Gabbiani et al., 1972. J. Exp. Med., 137: 719-726
 Kischer et al., 1982. Hum. Pathol., 13: 819-824
 Mollenhauer, 1963. Stain Technol., 39: 111-114
 Oda et al., 1988. Exp. Mol. Pathol., 49: 316-329
 Ohtani y Sasano, 1980. Virch. Arch. A. Path. Anat. and Histol., 385:247-26
 Rudolph et al., 1981. Ann. Thorac. Surg., 31: 373-376
 Tomasek et al., 1987. J. Bone Joint. Surg. (AM), 69: 1400-1407
 Varela et al., 1978. Morfología Normal y Patológica (A). 2: 215-231

Fig 1. A - Célula mioepitelial (M), en transformación a miofibroblasto, en cuyo citoplasma se observan haces de microfilamentos (►). Espacio intercelular (★) ocupado por microvellosidades y por un material finamente granular. 5.000X. **B** - Desmosomas (→) que unen una célula mioepitelial en transformación y una epitelial. 7.500X. **C** - Unión intercelular menos diferenciada (→) uniendo una célula mioepitelial en transformación y una epitelial. 11.500X. Animal sacrificado a los 60 minutos de la administración del antígeno.

Fig 2. Célula mioepitelial (M) en transformación a miofibroblasto. Uniones intercelulares (►) entre dicha célula y una célula epitelial (E). Animal sacrificado a los 90 minutos de la administración del antígeno.

ELEMENTOS CITOESQUELETICOS DE LA ZONA CORTICAL DE LOS OOCITOS MADUROS DE MOLUSCOS POLIPLACOFOROS.

M.DURFORT y J. GARCIA VALERO

Unitat de Biologia cel.lular., Facultat de Biologia., Universitat de Barcelona., Diagonal 645., 08071 BARCELONA.

Introducción: La aparente pasividad de los oocitos cesa en el momento que se produce la fecundación de los mismos. Efectivamente, tras la penetración del espermatozoide y la correspondiente reacción acrosómica, sigue automáticamente la reacción cortical, por la que los granos corticales, ubicados en la periferie de la célula germinal femenina, se abren al exterior liberando su contenido que dará lugar a la cubierta de fecundación. La detección de tubulina alfa y de actina a nivel de los gránulos corticales no deja de ser interesante para explicar la rápida y coordinada extrusión de los mismos.

El proceso de la fijación provoca inevitablemente cierto choc, que en el caso de los oocitos maduros de pilipacóforos, da la reacción cortical.

Material y Métodos: Se han estudiado dos especies de poliplacóforos: Trachydermon cinereus y Acanthochitona fascicularis, procedentes de Santander (Cantábrico) y Cubelles (Mediterráneo). Aisladas las gónadas femeninas maduras, unas se fijaron convencionalmente con glutaraldehído 3,5% tamponado con cacodilato, seguido de OsO₄ 1,5% igualmente tamponado; otras fueron fijadas con paraformaldehído 4% - glutaraldehído 0,1% en PBS 0,1M, englobado el material en una matriz de BSA fue congelado con N₂ líquido. Los cortes obtenidos con ultramicrotoma fueron incubados con anticuerpos específicos anti-actina y anti-tubulina alfa, detectándose su unión específica mediante el uso de anticuerpos secundarios conjugados con partículas de oro coloidal de 14 nm.

Resultados y Discusión: La zona cortical de los oocitos maduros de las dos especies estudiadas presenta una gran riqueza de estructuras vesículo-membranosas, destacando los dictiosomas hiperdilatados y los gránulos corticales, habiendo ocasionalmente hallado raíces ciliares (DURFORT y GARCIA VALERO, 1989 a y 1989 b), hecho muy poco frecuente en las células germinales femeninas.

Los gránulos corticales, de contenido muy laxo y poco electrondenso, proceden, en las especies estudiadas, de los dictiosomas y si bien se disponen regularmente en la periferie de los oocitos, hay una cierta concentración de los mismos, en la zona donde el oolema emite una emergencia con mayor número de microvillis (Fig.1), dicha zona podría corresponder a una área morfológicamente y bioquímicamente diferenciada y más asequible a los espermatozoides que el resto del oocitos, como apunta LONGO (1988) en su revisión sobre los cambios que experimenta la cubierta oocitaria tras el proceso de la fertilización, a nivel de la escala zoológica.

En esta zona cortical de los oocitos hay escasos elementos del deutero-plasma, efectivamente las plaquetas vitelinas y las inclusiones lipídicas, muy abundantes en ambas especies, se hallan en zonas más profundas del endoplasma oocitario (DURFORT et al.1989 a).

El marcaje con los anticuerpos nos ha permitido detectar la presencia de tubulina alfa en la periferie de los gránulos corticales (Fig.3) y también la presencia de actina (Fig.2), ésta se halla en la matriz del gránulo cortical. Dado que tras la penetración del espermatozoide sobreviene automáticamente la reacción cortical, por la que los gránulos corticales evacuan al exterior su contenido, mediante una extrusión de los mismos, el hecho de que se encuentren proteínas contráctiles asociadas a ellos permite entender mejor su dinamismo y su sincronización.

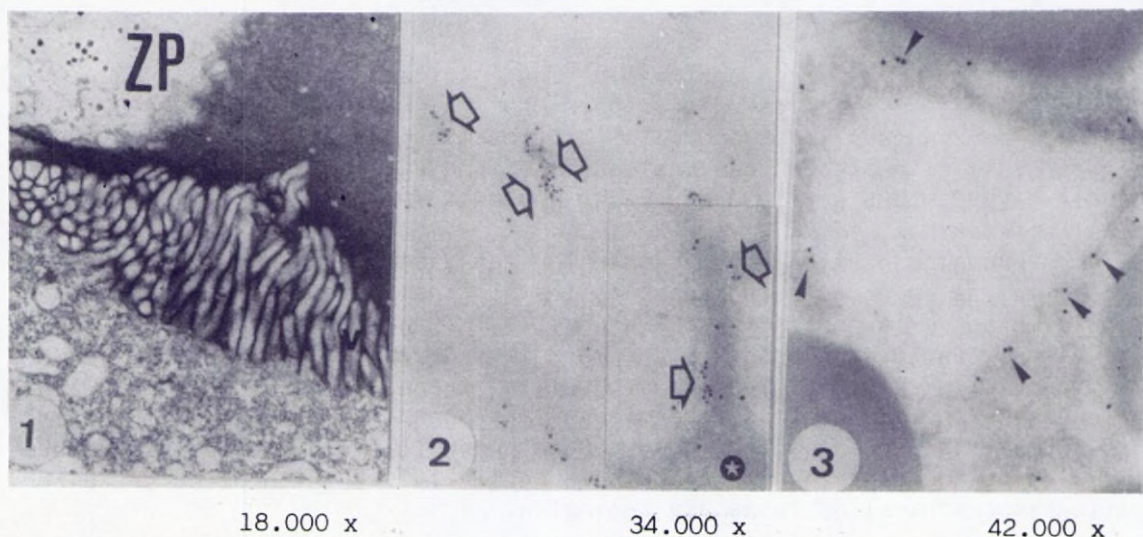
Cabe destacar que hemos marcado igualmente actina en la superficie de los microvillis, y distribuida de una forma totalmente aleatoria (Fig.2★).

Dado que el proceso de la fijación, por muy isotónicos que sean los medios utilizados, nos provoca una reacción cortical espontánea en los oocitos maduros de las dos especies de moluscos polioplacóforos estudiadas, hace que sea éste un material muy idónea para poder seguir todas las etapas del proceso. Queda por dilucidar el significado que puedan tener las raices ciliares halladas en esta zona periférica así como su origen.

Bibliografia DURFORT,M.-GARCIA VALERO,J. (1989a).- El complexe de Golgi i els grànuls corticals en els oòcits d'*Acanthochitona fascicularis* (Mollusca Polyplacophora). Biologia de la reproducció.,Vol.1:131-144.

DURFORT,M.-GARCIA VALERO,J. (1989b).- Estructures del tipus de les arrels ciliars en oòcits de Mol.luscs Polyplacófors ., Biologia del desenvolupament.,Vol.7:1-15.

LONGO,F.J. (1988).- Reorganization of the Egg Surface at Fertilization. Intern.Rev.Cytol.,Vol.113:233-269.



ULTRAESTRUCTURA DE LAS AREAS PIGMENTADAS AMPULARES DE MERIONES UNGUICULATUS.

C. Escobar¹, F.P. Garcia Ortega¹, A. Zuasti², y C. Ferrer².

Servicio de Otorrinolaringología¹ y Departamento de Biología Celular².

Hospital Virgen Arrixaca¹ y Facultad de Medicina². Murcia.

Introducción:

La distribución de las células pigmentarias en el oído interno varía según las especies, situándose principalmente en la cóclea, órgano vestibular y saco endolinfático.

La ultraestructura de las células pigmentarias ha sido descrita en el laberinto posterior de cobaya (Savin, 1965; Kimura, 1969; LaFerriere y col., 1974), en rata y en humanos (Igarashi y col., 1989).

El objetivo de este estudio es comprobar la existencia de células pigmentadas en las paredes ampulares del Jerbo y establecer sus características ultraestructurales.

Material y Métodos:

Se seleccionaron veinte jerbos (*Meriones unguiculatus*) adultos y sanos a los que se extrajeron ambos huesos temporales procediéndose inmediatamente a la fijación perilinfática con glutaraldehído 3'5 % (3 horas). Se microdisecionaron las ampollas de los canales semicirculares eliminando sus envolturas óseas mediante pinzas. A las 24 horas se realiza la potfijación en tetróxido de osmio 1 % (1 hora), se deshidrata en alcohol y se incluye en epon. Tras la realización de secciones ultrafinas con un ultramicrotomo LKB III, estas se tiñen con acetato de uranilo y citrato de plomo y se procede a su estudio en un microscopio electrónico ZEISS EM 10 C.

Resultados y Discusión:

Bajo lupa de disección, la existencia de áreas pigmentadas en las ampollas de *M. unguiculatus* es constante de un animal a otro estableciendo patrones característicos semilunares en los extremos canaliculares. La apertura utricular está rodeada de pigmento parcialmente en la ampolla horizontal y casi completamente en la superior, estableciendo continuidad con el de la pared utricular. El extremo utricular de la ampolla posterior está completamente rodeado de células pigmentadas.

A nivel ultraestructural, las células pigmentarias de las regiones ampulares se localizan subepitelialmente siguiendo la distribución de las células oscuras (dark cells). El epitelio está formado por una capa de células cilíndricas cuya membrana celular muestra en la zona apical microve-

llosidades escasas y complejos de unión. En la porción basal hay gran cantidad de invaginaciones con numerosas mitocondrias (fig.1).

Las células pigmentarias pueden aparecer aisladas o agrupadas, presentando una morfología irregular con núcleos excéntricos que muestran algunas indentaciones (fig.2). En el citoplasma hay algunas mitocondrias con escasas crestas, cisternas de retículo endoplasmático, algunos ribosomas libres y numerosos melanosomas homogéneos rodeados de una fina membrana (fig.3). La membrana plasmática muestra invaginaciones y vesículas en formación. Existe una estrecha relación con los capilares y con terminaciones nerviosas mielínicas (fig. 2 y 3).

Parece probable que estas células tienen un importante papel en la actividad metabólica de las regiones ampulares del oído interno de *M. unguiculatus*, tal y como se ha descrito en otras especies de mamíferos.

Fig. 1. Disposición de las células pigmentarias bajo el epitelio ampular de *M. unguiculatus*. 3.500 X.

Fig. 2. Célula pigmentaria con numerosos melanosomas contactando con una fibra nerviosa mielínica. 4.000 X.

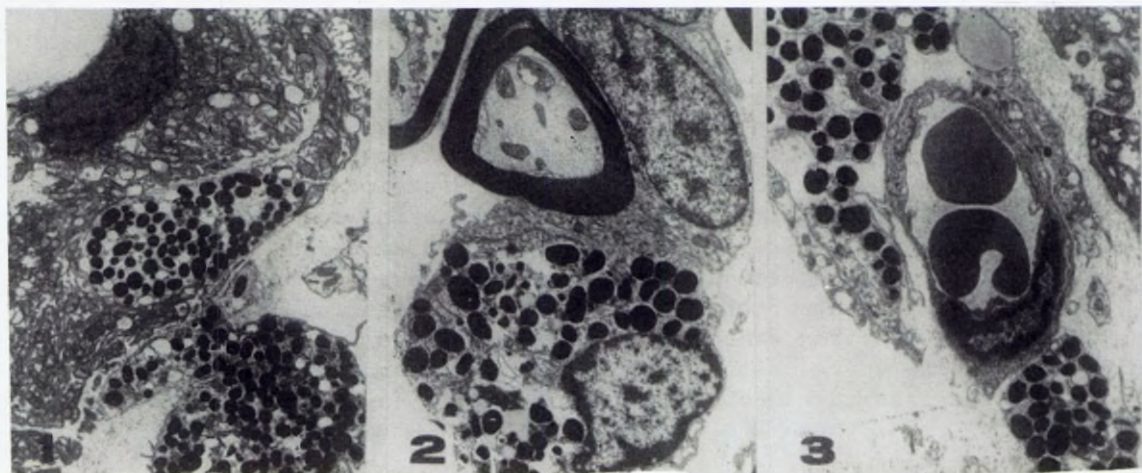
Fig. 3. Células pigmentarias relacionadas con un capilar. 3.500 X.

Bibliografía: Igarashi, Y., I. Takeyama, and I. Takahashi. (1989). Melanocytes in the vestibular dark cell areas in human fetuses. *Acta Otolaryngol.* (Stockh.), 108, 9-18.

Kimura, R. (1969). Distribution structure and function of dark cells in the vestibular labyrinth. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 78, 542-561.

LaFerriere, K.A., I.K. Arenberg, J.E. Hawkins and L.G. Johnsson. (1974). Melanocytes of the vestibular labyrinth and their relationship to the microvasculature. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 83, 685-694.

Savin, C. (1965). The blood vessels and pigmentary cells of the inner ear. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 74, 611-622.



VARIACIONES ULTRAESTRUCTURALES DEL POLEN DURANTE EL CULTIVO *IN VITRO* DE ANTERAS DE *Capsicum annuum*.

FADON B, OLMEDILLA A y RISUEÑO MC

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLOGICAS, CSIC,

VELAZQUEZ 144, 28006 MADRID

Introducción: El cultivo *in vitro* de polen para la obtención de haploides es de suma importancia en la Mejora Vegetal. El polen puede, en ciertas condiciones, desviarse de su vía gametofítica para dar lugar a embriones haploides siguiendo la vía androgénica (1). Los trabajos sobre cultivo *in vitro* de anteras son escasos debido a la dificultad que entraña el que para cada especie e incluso para cada variedad, se requieran condiciones diferentes para el cultivo (1,2;3). En este trabajo se han puesto a punto las condiciones óptimas del cultivo de anteras de pimiento estudiando al MO y al MET los cambios que ocurren durante el desarrollo del polen *in vitro*.

Material y Métodos: Anteras de *Capsicum annuum*, tras un pretratamiento de 48 h a 4°C de los botones florales, se han cultivado en medio sólido de Murashige y Skoog (2,3) con 2,4-D y kinetina, durante 8 días a 35°C en oscuridad y 4 días a 25°C con un ciclo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. A continuación se transfirieron las anteras a medio fresco manteniéndolas en las mismas condiciones. El número de núcleos se ha determinado con DAPI al MO. Para el estudio al MET las anteras se fijaron con glutaraldehído-osmio y se incluyeron en Epon, tiñendo los cortes con uranilo y plomo.

Resultados y Discusión: Para la puesta a punto de las condiciones de cultivo se ha seguido en primer lugar la evolución morfológica de la antera. Las anteras, que contienen polen vacuolado (Fig. 1) o bicelular temprano, tras el pretratamiento a 4°C aparecen amarillas y tersas. Después de 8 días a 35°C mantienen su color engrosándose ligeramente. Tras 16 días empiezan a tomar un color pardo-marrón y después de 30 días la antera degenera, pierde su tersura y aparece marrón oscuro. Los primeros granos polinucleados (Fig. 7) se observan tras 8 días de cultivo mediante la tinción con DAPI, específica para DNA, habiéndose encontrado granos de hasta 9 núcleos. Después de 48 h a 4°C algunos granos se desvían a la ruta androgénica y muestran dos núcleos como se observa al MO tras la tinción con acetocarmín (Fig. 2). A nivel

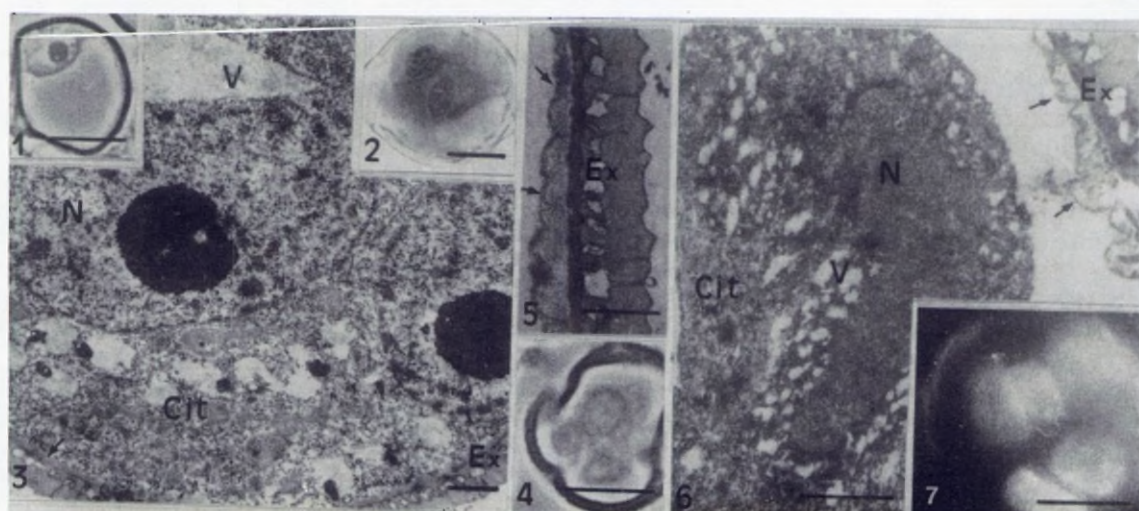
ultraestructural se observa una gran riqueza de orgánulos citoplásmicos con numerosos ribosomas y plastidios desprovistos de almidón, la vacuola aparece fragmentada conteniendo inclusiones opacas a los electrones con un tonoplasto denso, los núcleos presentan la cromatina bastante descondensada (Fig. 3). La pared muestra un material fibrilar entre el plasmalema y la intina que se engrosa a medida que se hace más largo el cultivo (Figs. 3 y 5). El origen de esta capa fibrilar es aún desconocido y requiere un estudio más detallado, que estamos realizando. Después de 8 días a 35°C en cortes semifinos se observan algunos granos con tres núcleos (Fig. 4). Al MET su citoplasma es muy denso a los electrones y rico en orgánulos con abundantes plastidios y cisternas de retículo endoplásmico. Las pequeñas vacuolas presentan un tonoplasto muy denso. Los núcleos aparecen lobulados con su cromatina muy descondensada (Fig. 6).

El estudio de las variaciones ultraestructurales que se producen en cultivo tanto en nuestro material como en otras especies (4 y 5) contribuirá a una mejor comprensión del complejo proceso de la androgénesis.

Barra M.O. 10µm. Barra M.E.T. 1µm.

Bibliografía:

- 1) Raghavan V (1986) Embryogenesis in Angiosperms. Cambridge Univ. Press. NY. USA.
- 2) Morrison RA, Koning RE & Evans DA (1986) Handbook of Plant Cell Culture, Vol.4, 550-573. McMillan New York.
- 3) Dumas de Vaulx R, Chambonnet D & Pochard E (1981). Agronomie, 1(10), 859-864.
- 4) Zaki MAM & Dickinson HG (1990) Protoplasma 156, 149-162.
- 5) Sangwan RS & Camefort H (1983) Histochemistry 78: 473-480.



EL USO DEL 2-NAFTILTIOLO ACETATO (2-TNA) COMO SUBSTRATO PARA LA DEMOSTRACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA ESTERASA NO ESPECIFICA EN LINFOCITOS HUMANOS. Estudio con microscopía electrónica de barrido.

Fernández-Segura, E., García López, JM., Gutierrez, A., Campos, A.

Departamento de Histología y Biología Celular. Facultad de Medicina. Universidad de Granada.

Introducción:

La demostración de la actividad enzimática esterasa no específica (NSE) ha permitido distinguir distintas poblaciones celulares hematopoyéticas: monocitos, histiocitos, linfocitos (1, 2). Por otra parte, se ha demostrado que la actividad enzimática NSE permite identificar diferentes subpoblaciones de linfocitos T (3). El objetivo del presente trabajo es la aplicación de técnicas citoquímicas ultraestructurales para la demostración de la actividad enzimática NSE a la microscopía electrónica de barrido. Asimismo, analizaremos los patrones de distribución de dicha actividad enzimática en linfocitos humanos de sangre periférica (PBLs).

Material y Métodos:

Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas fueron aisladas mediante centrifugación sobre gradientes de densidad de Ficoll-Paque ($d: 1.077 \text{ g/ml}$). PBMC fueron depleccionadas de células adherentes (PBLs) mediante incubación en frascos de cultivos durante 1h a 37°C , pCO_2 5%. Para la demostración de la actividad NSE realizamos una modificación de la pauta metodológica establecida por Payne y cols. (2), utilizando como sustrato 2-naftiltiol acetato (2-NTA). Las muestras fueron procesadas para SEM en modo BEI siguiendo las pautas previamente establecidas (4).

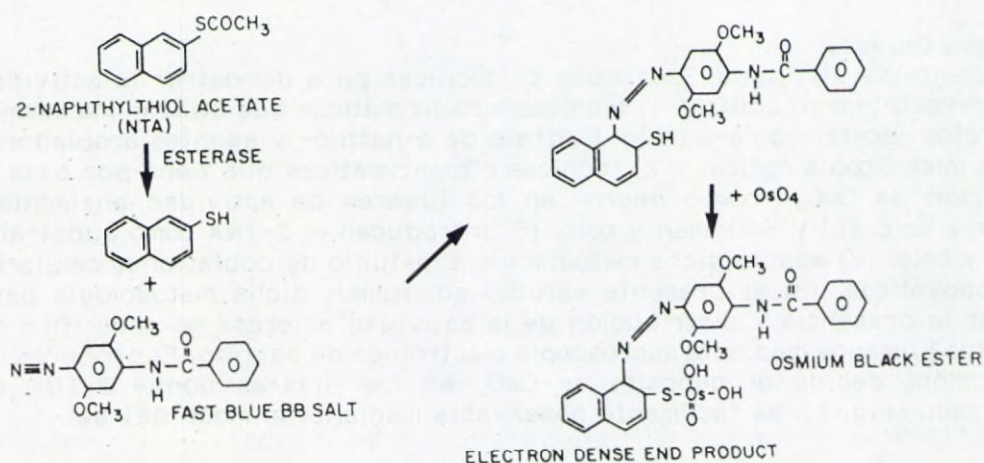
Resultados y Discusión:

Basicamente se distinguen dos tipos de técnicas para demostrar la actividad NSE a nivel ultraestructural: 1) técnicas citoenzimáticas que utilizan los mismos sustratos -acetato de α -naftilo-, butirato de α -naftilo- y agentes acopladores que en microscopía óptica; y 2) técnicas citoenzimáticas que tienen por base la deposición de OsO_4 -osmio negro- en los lugares de actividad enzimática. Hanker y cols. (5) y Seligman y cols. (6) introducen el 2-TNA como sustrato. Payne y cols. (2) adapta dicha metodología al estudio de poblaciones celulares hematopoyéticas. En el presente estudio adaptamos dicha metodología para analizar la presencia y distribución de la actividad esterasa no específica en linfocitos humanos mediante microscopía electrónica de barrido. El producto de la reacción, debido al depósito de OsO_4 en los lugares donde 2-TNA es hidrolizado (Fig. 1), es fácilmente observable mediante el modo BEI del

microscopio electrónico de barrido. El análisis de dicha actividad enzimática puso de relieve la existencia de un patrón de distribución focal, caracterizado por un gránulo unico, aislado, con un diámetro de 0.3-0.7 μm . La observación con microscopía electrónica de barrido mediante imágenes por electrones secundarios (SEI) muestra que dichos elementos celulares se caracterizan por una superficie lisa con escasos y cortos microvillitis. Como se desprende, una vez más, de nuestros resultados, la citoquímica ultraestructural aplicada a la microscopía electrónica de barrido permite una identificación de las diferentes actividades citoenzimáticas desde criterios topológicos y diferenciativos.

Bibliografía:

- 1) Payne C, Kim H, Pangalis GA, Rothman A, Rapaport H. Histochem J 1980, 12:71.
- 2) Kim H, Pangalis GA, Payne BC, Kadin ME, Rappaport H. Am J Pathol 1982, 106:204
- 3) Knowles DM, Hoffman T, Ferrarini M, Kunkel HG. Cell Immunol 1978, 35:112.
- 4) Fernández-Segura E, Garcia JM, Campos A. Histochemistry 1990, 94:315.
- 5) Hanker JS, Yates PE, Clapp DH, Anderson WA. Histochemie 1972, 30:201.
- 6) Seligman AM, Ueno H, Wasserkrug HL, Hanker JS. Ann Histochem 1966, 11:115



ULTRAESTRUCTURA DE LA PIEL DE SPARUS AURATUS (TELEOSTEO)

C. FERRER¹, A. ZUASTI¹ y M. GARCIA²

BIOLOGIA CELULAR¹ Y SERVICIO DE MICROSCOPIA ELECTRONICA²

FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD DE MURCIA.

Introducción:

La piel de los peces presenta estructuras especializadas como microcrestas, escamas, ordenación típica de las fibras colágenas de la dermis (Hawkes, 1974; Schliwa, 1975) y cambios de coloración como mecanismo de adaptación al medio (Bagnara, 1983; Fujii y Oshima, 1986). Son numerosos y recientes los trabajos realizados sobre los tipos celulares de la piel que intervienen en los cambios de color (Matsuno e Iga, 1989; Obika y Meyer-Rochow, 1990); sin embargo los estudios acerca de las características ultraestructurales de las células epidérmicas son escasos.

Materiales y Métodos:

Ejemplares de S. auratus fueron capturados en su medio ambiente natural (Mar Menor de Murcia). Secciones de piel de 20 peces sanos se fijaron durante 3 h. en glutaraldehído al 3%, realizándose la postfijación en etróróxido de osmio al 1% durante 1 h. Se incluyeron en epon y se obtuvieron secciones ultrafinas con un ultramicrotomo LKB III. Se contrastaron con tinción de uranilo y citrato de plomo, y se examinaron con un microscopio electrónico Zeiss EM10C.

Resultados y Discusión:

La piel de S. auratus está formada por: epidermis, dermis e hipodermis. La epidermis consta de un epitelio estratificado no queratinizado con 4 ó 5 capas de células epiteliales cuya morfología varía de poligonal en las capas basales, a plana en las capas superiores. Las células poligonales próximas a la lámina basal se caracterizan por presentar un núcleo indentado heterocromático localizado centralmente. En el citoplasma se observan numerosas mitocondrias, perfiles de retículo endoplasmático rugoso, ribosomas libres y vesículas de pinocitosis, o bien contienen escasas organelas citoplasmáticas y numerosos haces de tonofilamentos. Ambos tipos celulares se unen entre sí por numerosas interdigitaciones, complejos de unión y desmosomas. Las células epiteliales de la superficie apical son planas con núcleo aplanado central y escasas organelas citoplasmáticas. La membrana plasmática forma numerosas microcrestas que intervienen en

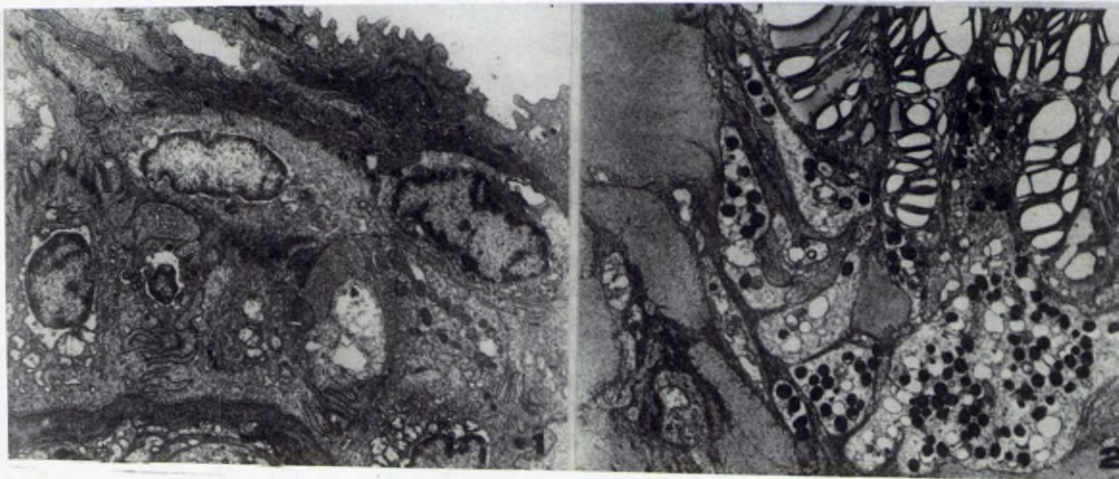
mecanismos de defensa (Fig. 1). Entre las células epiteliales, aparecen de forma característica, glándulas unicelulares mucosas. Estas células mucosas en sus estadios iniciales de secreción se caracterizan por localizarse en las regiones basales y presentar un núcleo excéntrico y gran cantidad de RER en el citoplasma, siendo escasos los gránulos mucosos. Las glándulas mucosas maduras se abren en el epitelio y tienen en su citoplasma gran cantidad de vesículas mucosas. La secreción de estas glándulas junto con las microcrestas de las células superficiales epidérmicas, actúan como mecanismo de defensa de los peces frente a las agresiones externas. La dermis está separada de la epidermis por la lámina basal, y está formada por fibroblastos y fibras colágenas, así como por numerosos cromatóforos, principalmente melanóforos e iridóforos que se localizan entre las fibras colágenas (Fig. 2). La hipodermis es muy delgada en esta especie y está formada por numerosas células adiposas, separadas entre sí por una red de fibras colágenas y capilares.

Figura 1. Epidermis de S. auratus constituida por cuatro capas de células epiteliales. 2500X.

Figura 2. Prolongaciones citoplasmáticas de melanóforos e iridóforos localizadas entre las fibras colágenas de la dermis. 4000X.

Bibliografía:

- Bagnara, J.T. (1983). Amer. Zool., 23: 465-478.
 Fujii, R. y Oshima, N. (1986). Zool. Science, 3: 13-47
 Hawkes, J. W. (1974). Cell Tiss. Res., 149: 147-158.
 Matsuno, A. y Iga, T. (1989). Pigment Cell Res., 2: 431-438.
 Obika, M. y Meyer-Rochow, V. (1990). Pigment Cell Res., 3: 33-37
 Schliwa, M. (1975). J. Ultrast. Res., 52: 377-386.



DIFERENCIAS ESTRUCTURALES DEL COMPLEJO RUMINO-RETICULAR OVINO
AL NACIMIENTO Y EDAD ADULTA MEDIANTE ANALISIS POR S.E.M.

A. FRANCO^{*}; J.M. VIVO^{*}; S. REGODON^{*}; M.T. GUILLEN^{*}; E. REDONDO^{**}.

UNIDAD DOCENTE DE ANATOMIA Y EMBRIOLOGIA *.

UNIDAD DOCENTE DE HISTOLOGIA Y ANATOMIA PATOLOGICA **.

Facultad de Veterinaria. Cáceres. U.N.E.X.

Introducción: Edad y dieta, son dos factores que resultan determinantes en la evolución estructural del complejo rumino-reticular. La transición de dietas lácteas propias de neonatos a raciones con concentraciones medias o altas en fibra, implica una evolución estructural que determina el crecimiento de las papilas y crestas inicialmente rudimentarias (1, 2, 3).

El presente trabajo analiza, mediante S.E.M., la evolución estructural del complejo rumino-reticular ovino relacionada con la edad (adulto y neonato) y subsecuentemente con la dieta, base determinante del crecimiento de papilas ruminales y crestas reticulares.

Material y Métodos: Concretas porciones de saco dorsal y ventral ruminales y retículo fueron fijadas en glutaraldehído al 5% en 0,1 M tampón fosfato, a pH 7,2. La fijación fue continuada a 4°C. durante 24 horas. Las muestras de tejido (8 X 3 mm) fueron fijadas durante dos horas en tetróxido de osmio al 0,5% en solución acuosa. Posteriormente fueron deshidratadas en acetonas ascendentes y sometidas a desecación en un punto crítico. Finalmente, las piezas fueron metalizadas y observadas en un estereo-microscopio a 10 KV y a diferentes ángulos.

Resultados y Discusión:

La dieta láctea, de fácil digestión, implica un esfuerzo mínimo de la mucosa ruminal, por lo que se muestra de apariencia superficial lisa y con papilas rudimentarias (Fig. 1). La sustitución progresiva de dieta láctea por una ración que, paulatinamente incrementa su contenido en fibra, exige un mayor esfuerzo de la mucosa ruminal (3), la cual pone en funcionamiento un doble mecanismo :

1.- Mecanismo de fuerza de la mucosa, morfológicamente representado por la expansión epitelial.

2.- Contracción de la muscular de la mucosa, consecuencia directa de la contracción de la túnica muscular.

Todo este esfuerzo de la mucosa, se traduce morfológicamente en una superficie lisa de la que emergen papilas ruminales de aspecto foliado y que alcanzan su máxima longitud (Fig. 2). En este sentido, son numerosas las investigaciones que apuntan una estrecha relación entre el crecimiento de las papilas ruminales y la absorción de productos de degradación (butírico y propiónico, especialmente) de la fermentación ruminal (1, 2).

Aunque la etiología y el mecanismo de acción son similares a los del rumen, en retículo existen fundamentalmente variaciones cuantitativas. De unas celdillas de pequeño tamaño, con crestas y papilas incipientes (Fig. 3), llegamos, en adulto, a unas celdillas y crestas de mayor tamaño junto a papilas incrementadas en grosor y longitud, y con tendencia a formas cónicas (Fig. 4). La extensión de la queratinización presente en las células reticulares es considerablemente mayor que la de las células ruminales y directamente relacionada con la actividad fisiológica de este compartimento.

Bibliografía: -1) FELL, B.F. (1969): Morphology of the absorptive surfaces - of the alimentary tract in nutrition of animals. Ed. D. P. Cuthbertson, pt 1, pp 295-334.

-2) Mc GAVIN, M.D.; MORRIL, J.L. (1976): SEM of ruminal papillas in calves. Fed various amounts and forms of roughage. Am. J. Vet. Res. Vol. 37, 5: 497-507.

-3) SCOTTA, A.; ISOBEL, C.G. (1973): Papillas form in the forestomach of the sheep. J. Anat. 116, 2: 255-267.



RUMEN
NACIMIENTO

RUMEN ADULTO

RETICULO
NACIMIENTO

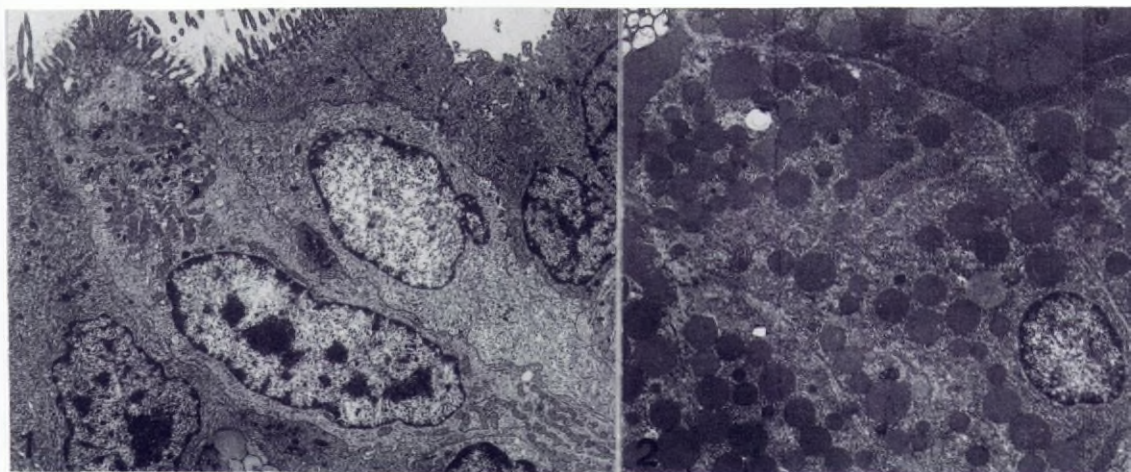
RETICULO ADULTO

de recorrido irregular, que confluyen en un ducto secretor. Los adenómeros están formados por células de dos tipos, seroso y mucosecretor. Las células serosas contienen numerosos gránulos electrodensos repartidos por todo el citoplasma (fig. 2). Las células mucosecretoras se localizan preferentemente en la entrada de los adenómeros y se caracterizan por su dotación de gránulos electrolúcidos. La ultraestructura de las células del conducto es de tipo mucosecretor, e incluye gránulos de secreción electrodensos. Con MEB el ostiología glandular se observa tapizado por un epitelio no ciliado.

El epitelio esofágico ciliado de los anuros adultos se ha observado en distintas especies (1,3,7). Además, la forma pseudoestratificada parece ser normal en este epitelio de anfibios (4). Células de ápice microvelloso similares a las de *R. perezi* no se han descrito para el esófago de otros anfibios. Estas células guardan alguna semejanza con las células de penacho (tuft cells) de ciertos epitelios de mamíferos (2). En *H. nebulosus* se observan dos tipos ultraestructurales de células ciliadas (7), mientras que en otras especies (2,4) y en *R. perezi* estas células no parecen diferenciarse en tipos distintos. Por el contrario, las células caliciformes aparentemente desarrollan dos tipos distintos tanto en el urodelo (7), como en nuestra especie. La presencia de glándulas es normal en el esófago de anfibios adultos (1,8). Estas estructuras están muy desarrolladas en *R. perezi*, posiblemente debido a las necesidades digestivas de su régimen predador generalista.

Bibliografía:

- (1) Geuze JJ. 1971. *Z. Zellforsch* 117, 87-102.
- (2) Iseki S, Kondo H. 1989. *Cell Tiss Res* 257, 545-48.
- (3) Norris JL. 1959. *J Exp Zool* 141, 155-72.
- (4) Patt DI, Patt G. 1969. *Comparative vertebrate histology*. Harper and Row, New York.
- (5) Pernkopf Lehner J. 1937. pp 349-476, *Handbuch der Vergleichenden Anatomie der Wirbeltiere* vol III. Bolk L et al. (eds). Urban und Schwarzenberg, Berlin.
- (6) Reeder WG. 1959. pp 99-149, *Physiology of the Amphibia*. Academic Press, New York.
- (7) Setoguti T, Matsumura H, Chen H-S. 1987. *Arch Histol Jap* 50, 3, 283-97.
- (8) Zamith APL. 1959. *Ann Esc Sup Agric "Luis de Queiroz"* 9, 357-470.



**Morfología microscópica del esófago de *Rana perezi* (Seoane, 1885)
(Amphibia, Anura) en estado adulto**

J. GALLEGO-HUIDOBRO, L.M. PASTOR, A. CALVO

Departamento de Biología Celular
Facultad de Medicina. Murcia

Introducción:

Estudios previos de la mucosa esofágica de anfibios han sido desarrollados en microscopía de luz desde principios de siglo(5). Recientemente Matsumura y Setoguti(1986) estudian superficialmente la mucosa esofágica de *Hynobius bulosus* adulto(Urodela). Igualmente, Setoguti y cols.(1987) estudian la mucosa del esófago de esta especie, utilizando microscopía electrónica de transmisión(MET) y microscopía electrónica de barrido (MEB). Respecto al orden de los anuros, no se encuentran estudios ultraestructurales realizados sobre esta región digestiva. Este estudio trata este tema en el anuro adulto *Rana perezi*, examinándose principalmente el epitelio digestivo.

Material y Métodos:

Los animales fueron disectados después de la aplicación de una inyección de pentobarbital. Para microscopía electrónica se fijó en glutaraldehído también al 2.5 % en cacodilato(pH 7.4), y se postfijó en solución de OsO₄ al 1% en cacodilato-sacarosa. La deshidratación se hizo en alcoholes, y para MET se incluyó en EPON. Las secciones ultrafinas fueron contrastadas con acetato de uranio y citrato de plomo. Para MEB las piezas se desecaron mediante el punto crítico y se metalizaron con oro. El estudio preliminar con microscopía de luz se realizó sobre cortes semifinos incluidos en EPON y sobre secciones de material incluido en parafina.

Resultados y Discusión:

La pared esofágica de *Rana perezi* está formada por una adventicia, una muscular externa, una capa conjuntiva subepitelial y un epitelio luminal. La superficie digestiva desarrolla largos pliegues longitudinales que están revestidos por un epitelio ciliado que presenta áreas no ciliadas. Este epitelio presenta una arquitectura columnar pseudoestratificada, y está formado principalmente por células ciliadas, caliciformes, de ápice microvelloso y basales. Las células ciliadas son el tipo mayoritario y parecen constituir una única categoría. Se distinguen dos tipos celulares caliciformes. El primer tipo forma gránulos electrodensos y polimorfos. El segundo tipo presenta gránulos electrolúcidos más voluminosos que los anteriores. Las células de ápice microvelloso se encuentran dispersas individualmente, y se caracterizan por su elevado número de mitocondrias y por presentar un penacho apical de largos microvilli (fig.1). Las glándulas consisten en adenómeros tubulares

MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA DE LA MUCOSA DE LA UNIÓN ESOFAGOGÁSTRICA Y DEL ESTÓMAGO DE RANA PEREZI (SEOANE,1885)(AMPHIBIA,ANURA) EN ESTADO ADULTO

J. GALLEGO-HUIDOBRO, L.M. PASTOR, A. CALVO

Departamento de Biología Celular.Facultad de Medicina.Murcia

roducción:

En los anfibios la conexión entre el esófago y el estómago ha sido estudiada con técnicas tradicionales de microscopía de luz(9,4a). Sin embargo, la histología de esta zona todavía no ha sido suficientemente documentada para esta clase, faltando estudios hechos con medios actuales de microscopía electrónica. Igualmente, la mucosa gástrica de los anuros ha sido estudiada ultraestructuralmente(11ab,7,4ab,8,5,2,6), aunque en todos los casos el tratamiento ha sido fragmentario. Esta comunicación trata la topografía de la superficie luminal, observada con microscopía electrónica de barrido(MEB), y la ultraestructura del epitelio digestivo de la unión esofagogástrica y del estómago de Rana perezi en estado adulto.

Material y Métodos:

Los animales fueron disectados inmediatamente después de la aplicación de una inyección intraperitoneal de pentobarbital. Muestras de 1 mm de lado fueron fijadas en glutaraldehído diluido al 2'5 % en tampón cacodilato 0'1 M, y postfijadas en tetraóxido de osmio disuelto al 1 % en cacodilato-sacarosa. La deshidratación se hizo en alcoholes de concentraciones crecientes, y se inyectó en resina EPON. Las secciones semifinas se contrastaron con acetato de uranio y citrato de plomo, y se examinaron con microscopía electrónica de transmisión(MET). Para MEB las muestras fueron lavadas, fijadas, postfijadas y deshidratadas como para MET, y, seguidamente, fueron sometidas al paso del "punto crítico" y metalizadas con oro.

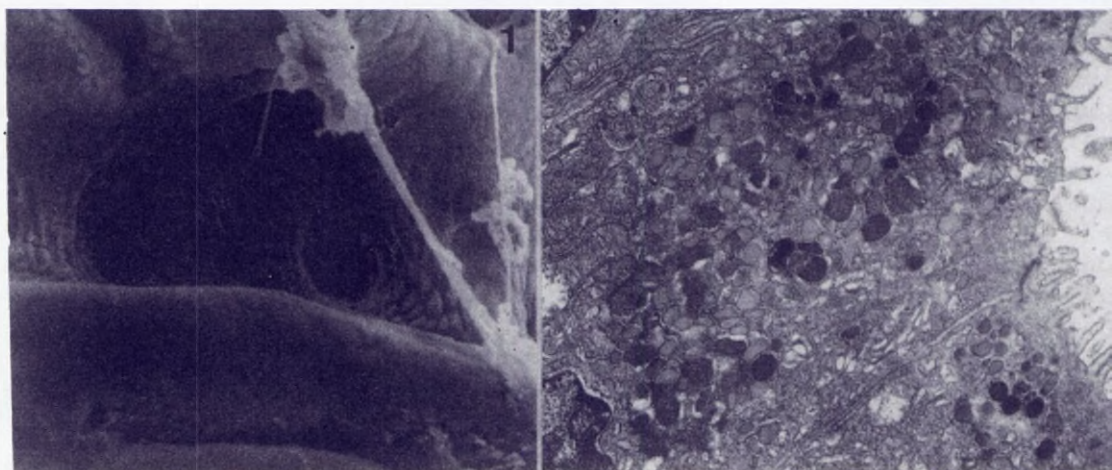
Resultados y Discusión:

En la unión esofagogástrica. En Rana perezi el cambio entre los tejidos esofágicos y los gástricos tiene lugar a lo largo de unos pocos milímetros de longitud. En general, las modificaciones afectan a la mucosa y a la musculatura. El epitelio superficial pasa del tipo pseudoestratificado ciliado al tipo monoestratificado mucosecretor. La transformación no es puntual, alternándose regularmente las áreas de epitelios esofágico y gástrico. El ducto de las glándulas se hace más corto que en las glándulas esofágicas. Las células de los conductos son secretoras, mientras que los túbulos glandulares están formados por células semejantes a sus homólogas del esófago. Histológicamente la unión esofagogástrica de ránidos adultos ha sido llamada "forestomach"(9,4a) (ante-estómago;2), pero no parece encontrarse en todas las especies(2), ni tiene una estructura constante interespecíficamente. El estómago. La pared gástrica forma unos cinco pliegues longitudinales de su-

perficie completamente circumbolucionada por numerosos pliegues menores, que delimitan entre sí estrechos surcos. En el fondo de éstos últimos se localizan numerosos ostíolos que se alinean irregularmente(fig.1). Se distinguen regiones, fundus y píloro. En el fundus las glándulas presentan células oxinticopépticas y mucosecretoras. Estas células mucosecretoras se encuentran en el cuello glandular. Las células mayoritarias de las glándulas pilóricas también son mucosecretoras(fig.2). Toda la superficie gástrica aparece revestida por un epitelio formado por células de un único tipo, mucosecretor. Este revestimiento es propio de anuros(4a,5) y de la mayoría de los vertebrados(10). En Rana los surcos alargados definidos entre los pliegues circumbolucionados presentan las fosetas gástricas, y los ostíolos son las aberturas glandulares. En mamíferos los orificios ostiolares corresponden a las fosetas(1), las células son tubulares(3). Además, la estructura de la mucosa del anuro es más simple que en mamíferos, posiblemente debido a los distintos requerimientos intestinales específicos del valor del cociente entre la superficie secretora y el volumen gástricos. Estas diferencias se establecerían en función de las distintas tallas y metabolismos. La citología de las glándulas fúndicas de Rana es muy semejante a la de otros vertebrados no mamíferos, en los que la célula principal es de tipo oxinticopéptico y es responsable de la producción de ácido clorhídrico y pepsina(12). Así mismo, la célula mucosa del cuello observada en estas glándulas parece ser común en otros ránidos (9,4a,5,2).

Bibliografía:

- (1) Al-Tikriti M et al. 1987. Scanning Microscopy 1,4,1871-80.
- (2) Díaz de Rada et al. 1983. Morf Norm Pat 7,1,25-36.
- (3) Elias H et al. 1978. Histology and human microanatomy. Piccin Editore, Padova.
- (4) a: Geuze JJ. 1971. Z Zellforsch 117, 87-102. b: Z Zellforsch 117, 103-17.
- (5) Giraud AS, Yeomans ND. 1981. Cell Tiss Res 218, 113-68.
- (6) Jonas L et al. 1988. Anat Anz Jena 165, 23-33.
- (7) Lillibridge CB. 1968. J Ultrastruct Res 23, 243-59.
- (8) Logsdon CD, Machen TE. 1982. Anat Rec 202, 73-83.
- (9) Norris JL. 1959. J Exp Zool 141, 155-72.
- (10) Patt DI, Patt GR. 1961. Comparative vertebrate histology. Harper and Row, New York.
- (11) a: Sedar AW. 1961. J Biophys Biochem Cytol 9, 1-17. b: 10, 47-57.
- (12) Smith H. 1968. Am Phys Soc 27



"Caracterización ultraestructural de las células GTH de Sparus aurata".

A. García Ayala, M. T. Lozano, J. A. Quesada, M. Villaplana y B. Agulleiro.

Dpto. Biología Celular Facultad de Biología.

Universidad de Murcia. 30071. Murcia. España.

Introducción:

Las células gonadotropas de hipófisis de peces teleósteos ejercen un papel importante en el control del ciclo reproductor (van Oordt y Peute, 1983). La dorada es un teleósteo hermafrodita protándrico en el que la región testicular de la gónada comienza a madurar durante el primer año de vida y es funcional en el segundo. La inversión sexual ocurre entre los dos y tres años, llegando a ser funcional la región ovárica en el tercero. Nuestro trabajo tiene como objeto la caracterización ultraestructural de las células GTH de ejemplares de dorada de edades comprendidas entre uno y cuatro años.

Material y Métodos:

Las hipófisis fueron fijadas en una mezcla de paraformaldehído al 2% y glutaraldehído al 1% en tampón cacodilato 0.1M siendo el 50% de las muestras post-fijadas en OsO₄ al 2%. Todas las glándulas fueron procesadas para su estudio microscópico electrónico según la técnica convencional. Se han utilizado anticuerpos contra gonadotropina de pez gato y carpa en la aplicación de la técnica inmunoglobulina-oro (van Bergen en Henegouwen y Leunissen, 1986).

Resultados y Discusión:

Las células GTH de hipófisis de dorada han sido caracterizadas ultraestructuralmente mediante la técnica de la inmunoglobulina-oro (van Bergen en Henegouwen y Leunissen, 1986) (Figura 1). Las células GTH muestran gránulos de secreción (300 nm) y glóbulos (700 nm) de densidad variable así como un RER bien desarrollado de cisternas dilatadas irregularmente distribuidas (Figura 2) a lo largo de todo el ciclo sexual de doradas cultivadas experimentalmente en el Mar Menor de Murcia. Además, de las células ya descritas, aparecen otros tipos morfológicos en las diferentes edades estudiadas. Cuando no existe un

completo desarrollo de la gónada la hipófisis se caracteriza por la existencia de células GTH morfológicamente inmaduras (Figura 3). Sin embargo, en animales sexualmente maduros y en adultos hermafroditas, la glándula presenta células totalmente degranuladas y con abundante RER (Figura 4), células con RER extraordinariamente desarrollado y células GTH involutivas (Figura 5). Las diferencias morfológicas pueden ser debidas a la actividad funcional de la hipófisis en relación con la edad del pez y con el desarrollo y maduración de las gónadas.

Figura 1. Detalle de una célula GTH. 24 meses de edad. Técnica de Ig-oro. X20000.

Figura 2. Célula GTH presente en todas las edades estudiadas. 24 meses de edad. X3750.

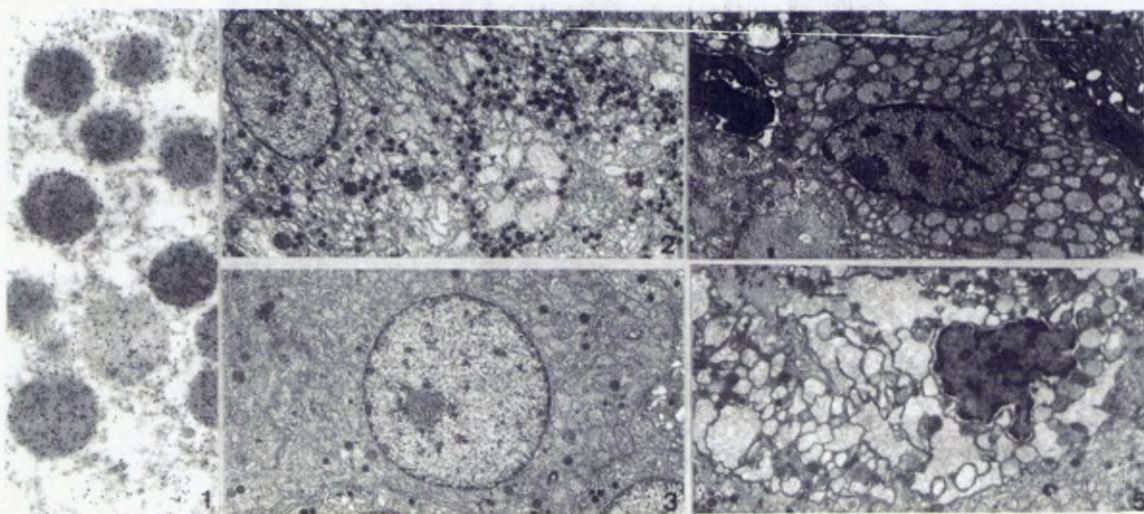
Figura 3. Célula GTH morfológicamente inmadura. 12 meses de edad. X3750.

Figura 4. Célula GTH degranulada. 48 meses de edad. X3750.

Figura 5. Célula GTH involutiva. 48 meses de edad. X3750.

Bibliografía:

- A. García Ayala, M.A. Zandbergen, J. Peute (1989). Netherlands J Zool, 39:41-55.
- J. Quesada, M.T. Lozano, A. Ortega, B. Agulleiro (1988). Gen Comp Endocrinol, 72:209-225.
- P.M.P. van Bergen en Henegouwen, J.L.M. Leunissen (1986). Histochemistry, 85:81-87.
- P.G.W.J. van Oordt, J. Peute (1983). Fish Physiology. Vol. IX. Academic Press, New York, pp:137-186.



CARACTERIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE LAS CELULAS ENDOCRINAS DEL TRACTO DIGESTIVO DE LUBINA (*Dicentrarchus labrax* L.) EN LAS DISTINTAS ETAPAS DE DESARROLLO

García Hernández, M.P.; ELBAL, M.T. y Agulleiro, B.

Biología Celular

Facultad de Biología. Universidad de Murcia. Murcia.

Introducción: Las células endocrinas de la mucosa del tracto digestivo de lubina han sido caracterizadas con técnicas inmunocitoquímicas y microscópico-electrónicas en larvas de 61 días después de la eclosión (García y cols., 1988). La ontogénesis de las mismas se ha estudiado con inmunocitoquímica (García Hernández y Agulleiro, 1990), habiéndose determinado la secuencia de aparición de células con inmunorreactividad-semejante (irs) a serotonina, met-enkefalina, gastrina, CCK, PYY, glucagón, insulina y somatostatina 25.

En el Presente trabajo se pretende la identificación ultraestructural de los distintos tipos de células endocrinas gastrointestinales de larvas de lubina, desde la eclosión hasta 25 días después de la misma, y su posible correlación con los datos previamente obtenidos.

Material y Métodos:

Larvas de lubina obtenidas en el Centro Costero del Mar Menor de Murcia, se procesaron para su estudio microscópico-electrónico convencional. Se estudiaron las muestras desde la eclosión y cinco días después de la eclosión (d.e.) (etapa I), de 9-15 días (etapa II), y de 25-55 días (etapa III).

Resultados y Discusión: La ultraestructura de las células endocrinas del tracto digestivo de *Barbus conchionius* muestra 4 tipos, que se distinguen por los gránulos de secreción (Rombout y cols., 1978). En larvas de lubina se encuentran por primera vez a los 5 días d.e., en la región posterior del tracto digestivo (Fig. 1), donde se habían identificado células con irs a serotonina. En la etapa II, aparece un tipo celular en la región presuntiva gástrica (Fig. 2), tres en el intestino, (Fig. 3) y un tipo celular en el recto (Fig. 4), que se puede corresponder con las células con irs a met-enkefalina. En la etapa III, un tipo celular en el estómago (Fig. 5), cuatro en el intestino (Fig. 6) y cuatro tipos en el recto (Figs. 7 y 8).

Es de destacar el escaso número y el pequeño tamaño de los gránulos de secreción de las células endocrinas encontradas, lo que puede explicar la no coincidencia del número de tipos celulares establecidos con inmunocitoquímica y con microscopía electrónica. Las características ultraestructurales de las células endocrinas halladas en las etapas I y

II, no se corresponden con las de ninguno de los tipos descritos en afultos (Visus y cols., 1988). Sin embargo, sí se pueden identificar tres de los tipos celulares endocrinos encontrados en el intestino y recto de larvas de la etapa III, con los de larvas de 61 días.

Se puede concluir que las células endocrinas gastrointestinales de lubina sufren un proceso de diferenciación durante la ontogénesis.

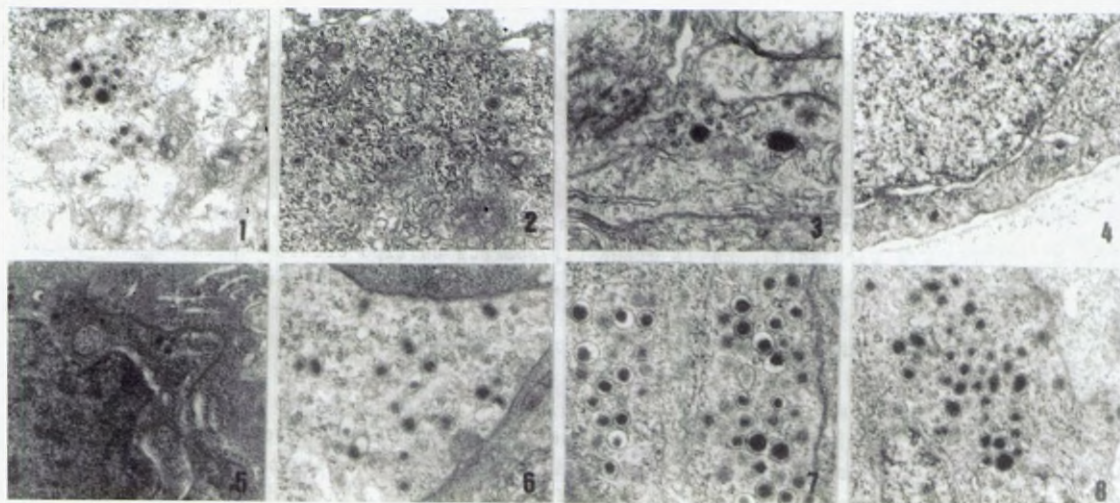
Bibliografía:

GARCIA HERNANDEZ, M.P.; LOZANO, M.T. and AGULLEIRO, B. 1988. Proceedings of "14th Conference of European Comparative Endocrinologists. Salzburg.

GARCIA HERNANDEZ, M.P. and AGULLEIRO, B. Gen. Comp. Endocrinol. (enviado)

ROMBOUT, J.H.W.M.; LAMERS, C.H.J. and HANSTED, J.G. 1978. J. Embryol. exp. Morph., 47: 121-135.

VISUS, I.G.; ABAD, M.E. and AGULLEIRO, B. 1988. Proceedings of "14th Conference of European Comparative Endocrinologists. Salzburg.



Figs. 1y4. 16.000X; Figs. 2,3,5,6,7y8. 15.000X

CARACTERIZACION ULTRAESTRUCTURAL DE LAS CELULAS ENDOCRINAS PANCREATICAS DURANTE EL DESARROLLO DE LA LUBINA (*Dicentrarchus labrax* L.)

García Hernández, M.P.; Lozano, M.T.; Agulleiro, B.

Biología Celular.

Facultad de Biología. Universidad de Murcia. Murcia.

Introducción: Existen pocos datos acerca de la ontogénesis del páncreas endocrino de tele-osteos. Tres tipos celulares han sido descritos en *Barbus conchionius* desde la aparición del primer islote, dos días después de la eclosión y un cuarto tipo celular, cuatro semanas más tarde (Rombout et al., 1979). En lubina se ha estudiado la ontogénesis de células con glucagón, con técnicas inmunocitoquímicas y microscópico-electrónicas (Beccaria et al., 1990). La secuencia de aparición de las células endocrinas pancreáticas (Agulleiro et al. 1989) y su organización (Agulleiro et al., 1990) durante el desarrollo ontogenético de esta especie, ha sido establecido mediante un estudio inmunocitoquímico previo. El objeto del presente trabajo es la caracterización ultraestructural de las mismas.

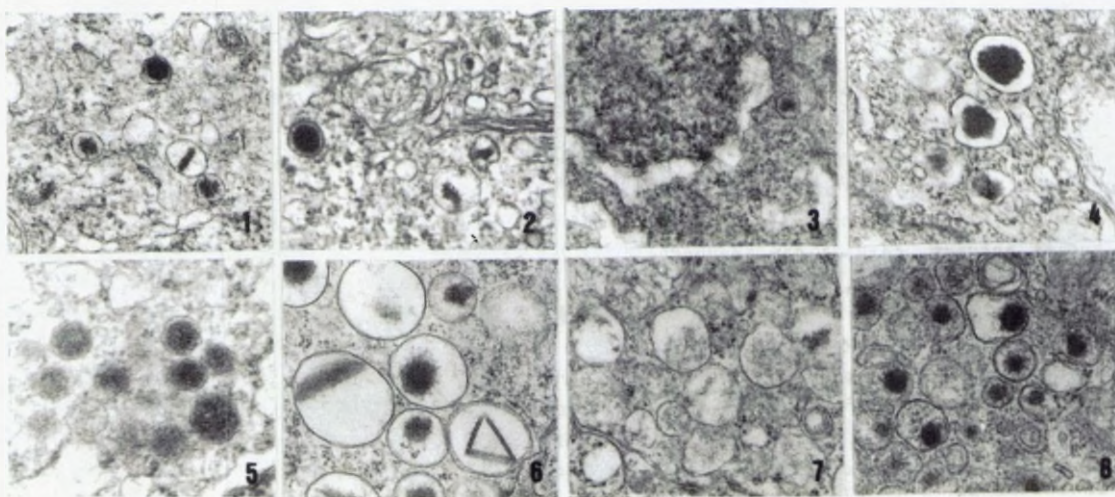
Material y Métodos: Larvas de lubina obtenidas en el Centro Costero del Mar Menor de Murcia se procesaron para microscopía electrónica convencional. Se estudiaron muestras comprendidas entre la eclosión y 55 días después de la eclosión.

Resultados y Discusión: En la eclosión, las células endocrinas pancreáticas se encuentran situadas en el seno del epitelio digestivo; las más frecuentes muestran una polarización de los dos tipos de gránulos de secreción, que son distintos en la zona basal y la supranuclear (Figs.1 y 2); algunas células, más indiferenciadas, contienen escasos gránulos de secreción y pueden encontrarse en división. En este estadio se habían identificado, en estudios previos, células con inmunorreactividad-semejante (irs) a insulina y somatostatina 25 (Agulleiro et al., 1989,1990). En larvas de 2-5 días, existen tres tipos celulares endocrinos, atendiendo a las características de sus gránulos de secreción. Las células inmunocitoquímicamente identificadas en esta etapa fueron células con irs a insulina, somatostatina 14 y somatostatina 25. En larvas de 9-13 días existe, además, un cuarto tipo celular, en la periferia de los islotes, con escasos gránulos de secreción (Fig.3). Los tipos celulares previamente identificados inmunocitoquímicamente en esta etapa presentaban irs a insulina, somatostatina 14, somatostatina 25 y glucagón (Agulleiro et al., 1989,1990). En larvas de 25-55 días se observan cinco tipos celulares que se corresponden con las cé-

lulas inmunocitoquímicamente descritas previamente (Agulleiro et al., 1989,1990) (Figs.4: Célula B en larvas de 25 días; 5:Célula PP de larva de 25 días; 6:Célula B de larva de 46 días; 7:Célula D de larva de 46 días; 8:Célula A de larva de 46 días).

Las células endocrinas pancreáticas de lubina, durante las primeras etapas de la ontogénesis (eclosión-13 días), se caracterizan por el escaso número y pequeño tamaño de los gránulos de secreción, que son diferentes de los que se encuentran en las células de larvas de 25 días en adelante y en el adulto (Lozano et al. 1990; Carrillo et al. 1986).

- Bibliografía:** AGULLEIRO, B.; GARCIA HERNANDEZ, M.P.; LOZANO, M.T. 1989. Proceedings of "Xith International Symposium on Comparative Endocrinology. Málaga.
- AGULLEIRO, B.; GARCIA HERNANDEZ, M.P.; LOZANO, M.T. 1990. Proceedings of "15th Conference of European Comparative Endocrinologists". Leuven.
- BECCARIA, C.; DIAZ, J.P.; GABRION, J. and CONNES, R= 1990. Gen. Comp. Endocrinol.78:80-92.
- CARRILLO, M.; ZANUY, S.; DUVE, H.; THORPE, A. 1986. Gen. Comp. Endocrinol. 61:287-301:
- LOZANO, M.T.; GARCIA AYALA, A.; ELBAL, M.T.; AGULLEIRO, B. 1990. Proceedings of "15th Conference of European Comparative Endocrinologists". Leuven.
- ROMBOUT, J.H.W.M.; RADEMAKERS, L.H.P.M.; HEES, J.P. van. 1979. Cell Tissue Res. 203:9-23



Figs. 1,2,4 y 8. 24.500X; Figs. 3,5 y 6. 27.650X;Fig. 7. 28.550X

OBSERVACIONES ULTRAESTRUCTURALES SOBRE EL PROCESO DE ENQUISTAMIENTO EN CILIADOS PERITRICOS

Silvia García, Almudena Guinea, Ana Sola y Susana Serrano.

Dpto. Microbiología I.

Fac. Biología. Univ. Complutense. 28040 Madrid.

Introducción: El proceso de enquistamiento constituye un fenómeno de diferenciación celular que supone una resistencia a condiciones ambientales extremas. La mayoría de los estudios realizados en ciliados se refieren al grupo de los hipotricos (1,2,6,7,10,11,12,13,14), siendo particularmente escasos en ciliados peritricos (3,5,8,9) especialmente en lo que se refiere a los aspectos ultraestructurales (9).

El objetivo de nuestro estudio es aportar nuevos datos ultraestructurales sobre el proceso de enquistamiento en dos especies de ciliados peritricos: Astylozoon pyriforme y Opisthonectha henneguyi.

Material y Métodos: Ambas especies proceden de muestras recogidas en una charca temporal de la "Dehesa de la Villa" (Madrid), siendo posteriormente cultivadas en medios de suelo-lechuga (1:3) y lechuga respectivamente.

El proceso de enquistamiento ha sido inducido por deprivatización de nutrientes.

El estudio se realizó a nivel óptico empleando la técnica de impregnación argéntica de Fernández-Galiano (4), y a nivel ultraestructural utilizando las técnicas convencionales de microscopía electrónica de transmisión.

Resultados y Discusión: Durante el proceso de enquistamiento en las dos especies de peritricos, se observa una reabsorción de los cilios paralelamente a una disminución del volumen, llegando la célula a adoptar una forma esférica.

Los precursores de la pared quística son sintetizados en el citoplasma y secretados posteriormente de forma paulatina. La pared quística está formada por tres capas morfológicamente diferenciadas, observándose además una división del mesoquiste en dos zonas en A. pyriforme.

En ambas especies se mantienen tanto la infraciliación oral como aboral, el argioma, los sistemas mionémicos y numerosos microtúbulos subpeliculares. Las mitocondrias se disponen en grupos en la periferia de la célula.

Por último se observa un proceso de condensación cromatínica macronuclear y un fenómeno de extrusión micronuclear.

El estudio del proceso de enquistamiento y del quiste de resistencia de los ciliados peritricos Astylozoon pyriforme y Opisthonectha henneguyi

indica la existencia de características intermedias y comunes con los dos tipos de quistes de resistencia propuestos por Walker y Mangel (13) para ciliados hipotricos: KR (kinetosome-resorbing) y NKR (non kinetosome-resorbing).

Los quistes de estas especies corresponden a quistes NKR teniendo en cuenta que tanto los cinetosomas como los microtúbulos, el argiroma y los sistemas mionémicos se conservan en el interior del quiste, sin embargo otras características tales como la formación de clusters mitocondriales, la reabsorción de cilios y la presencia de sólo tres envueltas en la pared quística corresponden a quistes KR. .

Nuestros resultados indican, por tanto, la necesidad de una nueva re-clasificación de los quistes de resistencia, no sólo del grupo de los hipotricos tal como sugieren Rios et al. (7) y Delgado et al. (2), sino también dentro del conjunto total de los ciliados. No obstante, consideramos necesarios nuevos datos ultraestructurales acerca de los quistes de resistencia de ciliados pertenecientes a otros grupos con el fin de poder comparar con exactitud las características comunes y diferenciales de los mismos.

Bibliografía: (1) Calvo et al.1986. Arch. Protistenkd, 132. (2) Delgado et al. 1987. J. Protozool., 34. (3) Dodd. 1962. J. Protozool., 9. (4) Fernández-Galiano. 1976. Trans. Am. Microsc. Soc.,95. (5)Finley y Lewis.1960. J. Protozool.,7. (6) Gutierrez et al.1983. J. Protozool.30. (7) Rios et al.1985. Protistologica,21. (8) Rosenberg.1938. Trans.Am.Microsc. Soc.57. (9) Ruiz y Anadón.1986. Trabajos Compostelanos de Biología,13. (10) Verni et al.1984. Protistologica,20. (11) Walker et al.1975. Trans.Am.Microsc. Soc.94. (12) Walker et al.1980. Protistologica,16. (13) Walker y Mangel. 1980. Protistologica, 16. (14) Walker y Hoffman.1985. Cytobios,44.

ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DEL GLOMERULO RENAL EN LA FILARIOSIS CANINA

Gómez-Villamandos, J.C.*, Moyano, T**, Rodríguez, J.L.*,
Morales-Lezcano, M.R. y Castellano, J.*

* Dpto. Morfología. U.L.P.G.C.

** Servicio Microscopía Electrónica. U. Córdoba.

Introducción:

La Filariosis es una zoonosis parasitaria producida por *Dirofilaria immitis*, que afecta principalmente al perro. Las Islas Canarias son una zona endémica de esta enfermedad, debido a las condiciones climáticas que permiten la persistencia de vectores.

El daño renal en perros con Filariosis es frecuente, presentando un cuadro lesional variado en el que parece jugar un papel importante la formación de complejos inmunes (1, 2), aunque se han observado perros con lesiones renales y sin cambios inmunopatológicos (4).

Material y Métodos:

Muestras de 14 perros afectados naturalmente por la enfermedad y con sintomatología manifiesta fueron eutanasiados. Una vez practicada la necropsia se tomaron muestras de parenquima renal que fueron fijadas en formaldehído al 10% tamponado y glutaraldehído al 2,5% en tampón fosfato. Las muestras fueron incluidas en parafina para el estudio estructural, y en Epon 812 para el estudio ultraestructural.

El estudio inmunocitoquímico se realizó sobre cortes en parafina empleando la técnica de inmunoperoxidasa directa (IPD) para la detección de IgG.

Resultados y Discusión:

Las lesiones glomerulares halladas en los perros estudiados se corresponden con glomerulonefritis membranosa (6/14), glomerulonefritis membranoproliferativa (5/14), amiloidosis (2/14) y glomerulonefritis membranoproliferativa con amiloidosis (1/14).

Mediante IPD hemos detectado depósitos de IgG a lo largo de la membrana basal de los capilares glomerulares en los casos de glomerulonefritis, proliferativa o no, mostrando el estudio ultraestructural que estos depósitos tienen una morfología granular electrodensa, localizándose sobre la membrana basal a nivel subendotelial, y como acúmulos a nivel intramembranoso y subepitelial (Fig. 1). La membrana basal aparece engrosada y de contornos irregulares. Los pies de los podocitos se muestran fusionados (Fig. 1).

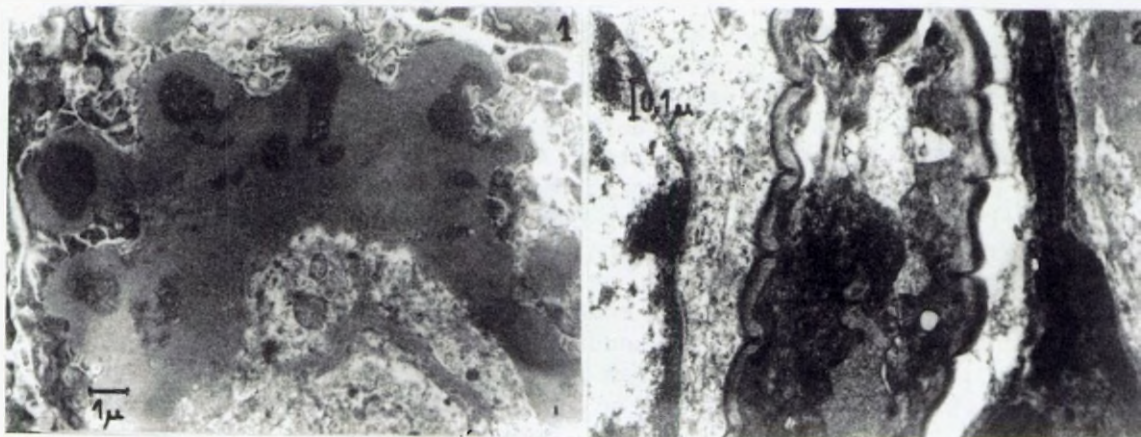
La presencia de microfilarias en los capilares glomerulares

es una observación frecuente en la Filariosis canina, siendo achacada a su presencia la formación de complejos inmunes (1, 2), lo cual podría corroborar en este trabajo por la observación de puentes de unión y zonas de íntimo contacto entre la cutícula de las microfilarias y las células endoteliales de los capilares glomerulares (Fig.2). Por otro lado, hemos observado, mediante IPD, y en los casos más avanzados de la enfermedad, que las microfilarias presentan una fuerte reacción anti IgG, por lo que esta Ig podría neutralizar los antígenos de superficie de la microfilaria, lo que apoyaría los estudios realizados experimentalmente sobre la existencia de antígenos circulantes (2). La participación de ambos mecanismos conjuntamente o en diferentes etapas de la patogenia de la enfermedad pueden determinar la formación de complejos inmunes.

El examen mediante microscopía electrónica confirma el caso de glomerulonefritis membranoproliferativa con amiloidosis, existiendo engrosamiento de las membranas basales y de la matriz mesangial, así como depósitos mesangiales de amiloide. La presentación de ambos cuadros lesionales de forma conjunta ha sido descrita en patología humana (3), pero no en Filariosis canina.

Bibliografía:

- 1.- Abramowsky, C.R. et al (1981). *Dirofilaria immitis*: Immunopathology of filarial nephropathy in dogs. *Am.J.Pathol.*, 104:1-12.
- 2.- Grauer, G.F. et al. (1987). Clinicopathologic and histopathologic evaluation of *Dirofilaria immitis*-induced. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 37:588-596.
- 3.- Miller, R.R. (1984). Membranoproliferative glomerulonephritis and amyloidosis. *Human Pathology*, 15:1185-1187.
- 4.- Simpson, C.F. et al. (1974). Glomerulosclerosis in canine heartworm infection. *Vet. Pathol*, 11:506-514.



ASPECTOS ULTRAESTRUCTURALES FUNCIONALES DEL ENDOTELIO

DE LOS CAPILARES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

zález Santander, R., Martínez Cuadrado, G., Toledo Lobo, M.V. y Martínez Alonso, J.

Departamento de "Ciencias Morfológicas y Cirugía"

HISTOLOGIA. Facultad de Medicina.

Universidad de Alcalá de Henares. Madrid.

Introducción:

La "barrera hematoencefálica" fué sugerida a partir de datos clínicos y experimentales, al comprobar que ciertos fármacos y los colorantes vitales, introducidos por vía sanguínea no llegaban a actuar o teñir el S.N.C. (SLOSKI y LEDUC, 1952 ; RODRIGUEZ, 1955). Estructuralmente, los capilares profundos del S.N.C. están cubiertos de una lámina basal y prolongaciones de las células gliales. (PETERS, 1961). La "barrera hematoencefálica" tiene tres niveles: 1º.-Endotelial, 2º.-Membrana basal, 3º.-Prolongaciones gliales. Para analizar lo que ocurre en estos tres niveles, hemos observado al M. los capilares más finos de un núcleo neuronal del S.N.C., principalmente endotelio y su membrana basal.

Materiales y Métodos:

Gatos domésticos fijados mediante perfusión vascular con glutaraldehído al 1,5 % en tampón de cacodilato sódico, lavados antes y después con solución de Ringer. El encéfalo se extrajo de la cavidad craneana cuando el animal se encontraba fijado y rígido. Posteriormente se diseccionó el mesencéfalo sumergido en tampón-sucrosa. Se postfijó en ácido ósmico al 1 % durante tres horas. Se incluyó en araldita, previo lavado en acetato de anilino al 2 %. Los cortes ultrafinos se tiñeron con citrato de plomo, y se observaron al microscopio electrónico de transmisión, tomando fotografías de los capilares del núcleo periacueductal que estaban entre las neuronas.

Resultados y Discusión:

Los capilares del núcleo mesencefálico son muy pequeños, continuos y sin fenestraciones. En ellos sólo se observa una célula endotelial por corte, que presenta un núcleo alargado con cromatina densa por debajo de la carioteca, y un estrecho citoplasma que contiene unos "glóbulos electrondensos osmófilos" de un diámetro entre 15,2 a 16,8 nm., que se encuentran libres y diseminados o agrupados por todo el citoplasma de la célula endotelial. (Fig A).

Además hemos observado, en el citoplasma de algunas células endoteliales unas "partículas alargadas muy electrondensas" de 14 a 35 nm. de longitud por 7,7 nm. de grosor. (Fig. B). A nivel de la "membrana basal" se ven también "partículas alargadas muy electrondensas" con idéntica morfología y dimensiones que en el citoplasma de las células endoteliales. (Fig B). Por fuera de la membrana basal, en íntimo contacto con la zona yustaendote-

lial, se observan varios haces de gliofilamentos, que rodean intimamente al capilar en sentido transversal y longitudinal.

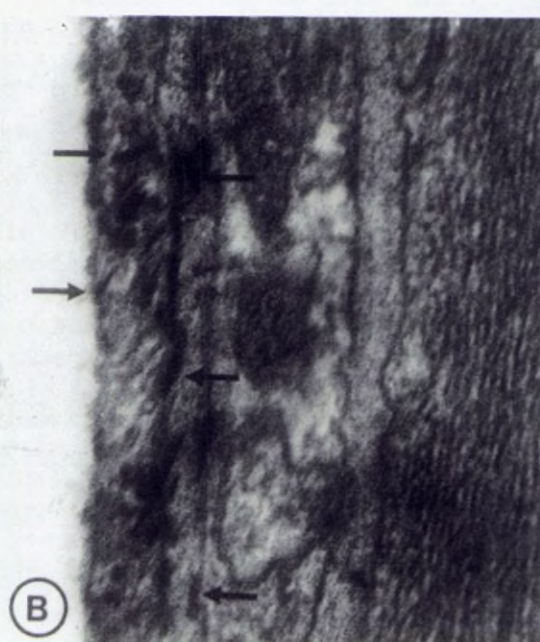
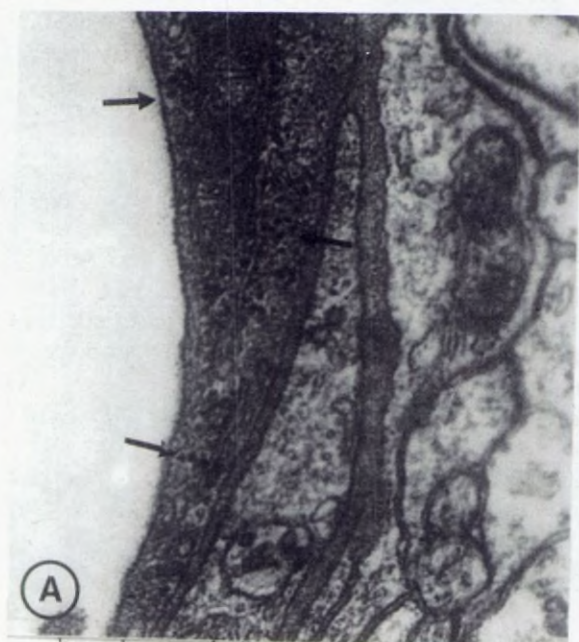
Se desconoce la naturaleza de los "glóbulos electrondensos osmiófilos", que contiene el citoplasma de las células endoteliales, pareciendo que por su morfología y dimensiones no son ni ribosomas ni glucógeno, con cuyas partículas hemos establecido, en principio, un diagnóstico diferencial. Se sugiere que puedan ser macromoléculas asimiladas de la sangre durante un proceso funcional normal realizado por la célula endotelial, que puede representar la "primera barrera" a la difusión encomendada a la "barrera hematoencefálica".

Igualmente desconocemos la naturaleza de las "partículas alargadas electrondensas" que se observan en el citoplasma de las células endoteliales y sobre la membrana basal circundante. Se sugiere la posibilidad de que puedan ser MACROMOLÉCULAS RETENIDAS por el endotelio y su membrana basal, en su función activa y defensiva del "primer y segundo nivel" de la "barrera hematoencefálica", que impide su paso al espacio pericapilar.

A pesar de esta posible interpretación, las imágenes que presentamos las sometemos a discusión entre los investigadores con más experiencia en este tema.

Bibliografía:

- PETERS, A.: J. Anat. 95 (Suppl): 20-22(1961).
- RODRIGUEZ, L.A.: J. Comp. Neurol. 102: 27(32(1955).
- WISLOCKI, G.B. and LEDUC, E.H.: J. Comp. Neurol. 95: 371-386(1952)



NUEVAS APORTACIONES SOBRE LAS SINAPSIS COMUNICADAS

EN EL NÚCLEO PERIACUEDUCTAL DEL MESENCÉFALO

González Santander, R., Martínez Cuadrado, G., Toledo Lobo, M.V. y Martínez Alonso, J.
Departamento de "Ciencias Morfológicas y Cirugía".

HISTOLOGÍA. Facultad de Medicina.

Universidad de Alcalá de Henares. Madrid.

Introducción:

Desde que CAJAL (1933) estableció la "teoría neuronista" y DE ROBERTIS y BENNETT (1954) descubrieron las vesículas sinápticas, el microscopio electrónico ha confirmado la independencia de la neurona, con la morfología característica de la estructura de la sinapsis. Últimamente GONZÁLEZ SANTANDER et al. (1988) observaron algunas excepciones a la teoría de la independencia de la neurona de CAJAL, al encontrar unas sinapsis axo-somáticas, en donde se continuaban la membrana pre con la postsináptica, delimitando una comunicación entre dos neuronas, que publicaron como "sinapsis comunicadas" y de las que aquí presentamos otras varias posibilidades de comunicación.

Materiales y Métodos:

Gatos domésticos fijados mediante perfusión vascular con glutaraldehído al 2,5 % en tampón de cacodilato sódico, lavados antes y después con solución de Ringer. El encéfalo se extrajo de la cavidad craneana cuando el animal se encontraba fijado y rígido. Posteriormente se diseccionó el mesencéfalo sumergido en tampón-sucrosa. Se postfijó en ácido ósmico al 1 % durante tres horas. Se incluyó en araldita, previo lavado en acetato de amoníaco al 2 %. Los cortes ultrafinos se tiñeron con citrato de plomo, y se observaron al microscopio electrónico de transmisión.

Resultados y Discusión:

La observación con el microscopio electrónico, de las sinapsis de las neuronas del núcleo periacueductal dorsal del mesencéfalo del gato nos ha evidenciado varios tipos de "sinapsis comunicadas":

1.- SINAPSIS AXO-SOMÁTICAS COMUNICADAS: Con una comunicación abierta entre la porción pre y postsináptica, la cual hace que exista un "paso" de continuidad. Hay dos puntos de unión de las membranas pre y postsinápticas que delimitan el sitio de "paso" entre las dos neuronas, por donde pueden pasar varias vesículas sinápticas al mismo tiempo. En algunas sinapsis se pueden ver trazos de "paso" en un mismo corte (Figura).

2.- SINAPSIS AXO-DENDRÍTICAS COMUNICADAS: Situadas al lado del soma de otra neurona, en donde la parte pre y la postsináptica tienen sendos sitios de "paso" con el soma de la neurona adyacente.

3.-SINAPSIS AXO-AXONICAS COMUNICADAS: En donde el botón presináptico tiene un sitio de "paso" o comunicación con el axón, hacia donde ya ha pasado alguna vesícula sináptica, la cual se puede observar entre los neurotúbulos.

4.-SINAPSIS COMPLEJAS COMUNICADAS AXO-SOMATICAS Y AXO-AXONICAS: En donde en un lugar, el botón presináptico se comunica por un amplio sitio de "paso" con el soma postsináptico, y en otro lugar, el mismo botón presináptico hace contacto sináptico con un axón, en donde se observan los microtúbulos.

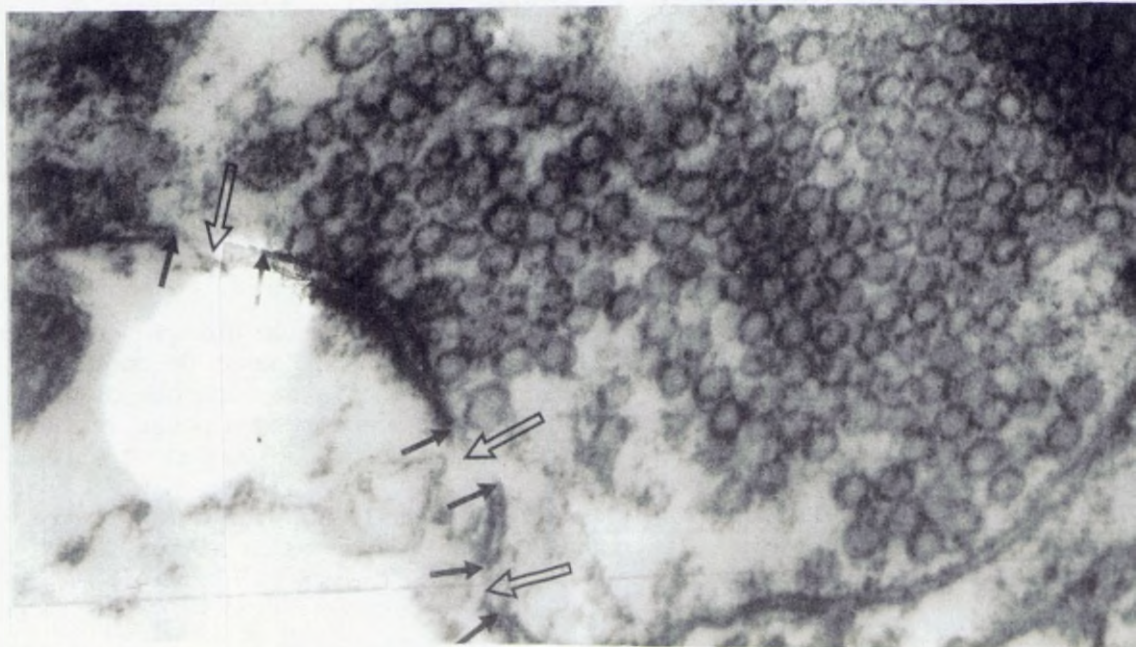
5.-SINAPSIS COMPLEJAS COMUNICADAS AXO-SOMATICAS Y AXODENDRITICAS: En donde el botón presináptico se comunica por un sitio de "paso" con el soma de una neurona, y por otro sitio de "paso" se comunica con la dendrita de otra neurona.

Estos cinco tipos de "SINAPSIS COMUNICADAS" podrían ser excepciones a la "Frontera de separación" preconizada por CAJAL(1933) entre las dos superficies de las neuronas puestas en contacto físico en la sinapsis. Por el lugar de "paso" pueden viajar las vesículas sinápticas, ya que algunas de ellas pueden observarse en la región postsináptica.

Todos estos hallazgos necesitan de una más amplia conformación por parte de otros autores, y sobre todo precisan de una mejor interpretación en el contexto de la "sinaptología moderna", tanto estructural como funcional.

Bibliografía:

- CAJAL, S.R.: Arch. Neurobiols. 13:217-291(1933).
- DE ROBERTIS, E. and BENNETT, H.S.: Federation. Proc. 13:35(1954).
- GONZALEZ SANTANDER, R. et al.: Acta. Anat. 132:74-76(1988).



ULTRAESTRUCTURA EN MEB Y ACTIVIDADES FOSFATASICAS EN APARATO DIGESTIVO DE *Halobatrachus didactylus*

M^aL. GONZALEZ DE CANALES*, M^aC. SARASQUETE, A. GRAU**, M. ROSETY y F.J. FERNANDEZ TRUJILLO***

*Lab. Biología. Inst.**Ciencias Marinas de Andalucía.**Opto. Ciencias Morfológicas, Fac. Medicina, UCA

Fac. Ciencias del Mar, UCA. Polígono del Rio San Pedro. Puerto Real (Cádiz)

Introducción: El tracto digestivo de peces teleósteos ha sido ampliamente estudiado y descrito morfológica e histológicamente para determinar la función de estructuras anatómicas especializadas en relación a los diferentes hábitos alimentarios (ALBERTINI-BERHAUT, 1987). Estos estudios, junto con los ultraestructurales y especialmente los histoquímicos e histoenzimáticos (GONZALEZ DE CANALES et al., 1987 y WILLIAMS and NICKOL, 1989), nos permiten ampliar el conocimiento de la función estructural del aparato digestivo de peces teleósteos y conocer la distribución de enzimas que participan en procesos de absorción.

Material y Métodos: El material objeto de estudio han sido diferentes porciones del aparato digestivo de *Halobatrachus didactylus* de la Bahía de Cádiz. Los tejidos fueron procesados de la forma habitual para su observación al microscopio electrónico de sccanning, Mod. Jeol // JSM 820. Para el estudio de las actividades fosfatásicas alcalina (E.C.3.1.3.1) y ácida (E.C.3.1.3.2) otras porciones fueron procesadas directamente sin fijar, en el criomicrotomo y su localización así como el efecto de diferentes compuestos (activadores e inhibidores) se realizó de la forma descrita en trabajos anteriores (SARASQUETE et al., 1990)

Resultados y Discusión: Las características histológicas, histoenzimáticas y morfoestructurales de *Halobatrachus didactylus*, no difieren significativamente a la de otros teleósteos marinos de similares regímenes alimentarios (KAPoor et al., 1975), entre las que destaca presencia de secreciones mucosas en el epitelio gástrico. Morfoestructuralmente el esófago se caracteriza por presentar repliegues primarios, tanto longitudinales como transversales (Fig. 1), donde se observan células epiteliales que presentan los microrelieves de protección característicos de teleósteos marinos (MEISTER et al., 1983). Entre las células epiteliales aparecen células mucosas secretoras de mucosustancias ácidas y neutras. En la parte anterior del esófago se observan botones gustativos que según MEISTER et al., (1983) seleccionan químicamente el alimento. En la zona de transición esófago-estómago destaca la sustitución del epitelio de tipo protector por otro de características absorptivas, constituido por cortos microvilli que forman un tupi-

do tapiz, constituyendo un importante centro de regulación osmótica (KIRSCH et al., 1985). La mucosa del estómago se caracteriza por presentar pliegues primarios transversales y secundarios dispuestos en todas las direcciones del espacio. Entre la superficie de las células epiteliales (gástricas) se observan orificios glandulares o foveolas gástricas y gotas de mucus (Fig. 2) presentes en otros teleósteos (SIS et al., 1979). La superficie del intestino presenta grandes repliegamientos longitudinales. Su epitelio absorptivo está caracterizado por largos microvilli.

La actividad fosfatásica alcalina es muy intensa en la chapa estriada de los enterocitos del intestino y en la porción glandular y stractum compactum del estómago, así como en los endotelios del sistema vascular. La fosfatasa ácida en el tracto digestivo de *Halobatrachus didactylus* presenta una distribución granular. La respuesta diferente de la fosfatasa alcalina del pez sapo marino frente a ciertos activadores e inhibidores como en otros teleósteos (GUTIERREZ et al., 1985) no sugiere la presencia de isoenzimas en el sistema digestivo de esta especie. La fosfatasa alcalina fue inhibida por L-fenilalanina (20 mM). Con L-tetramisole (5mM) y L-cisteína (10mM) se inhibe totalmente dicha actividad a nivel del estómago y parcialmente en otras porciones del aparato digestivo. La fosfatasa ácida es inhibida por NaF (10mM) y parcialmente sensible al tartrato potásico (10mM).

Bibliografía ALBERTINI-BERHAUT, J.- 1987. *J. Appl. Ichthyol.* 3:1-12
 GONZALEZ DE CANALES, M^aL. et al.- 1987. *Bol.Fisiol.Anim.* (Brasil)11:101-111
 GUTIERREZ, M. et al.- 1985. *Inv. Pesq.* 49(2):239-253
 KAPOOR, B.G. et al.- 1975. *Adv.Mar.Biol.* 13:109-239
 KIRSCH, R. et al.- 1985. In: *Transport processes, Iono- and Osmoregulation* pp:265-277. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York
 MEISTER, M.F. et al.- 1983. *Zoomorphol.* 102: 33-51
 SARASQUETE, M^aC. et al.- 1990. *Actas III Cong. Nac. Acuicultura*, 169-174
 SIS, R.F. et al.- 1979. *J. Fish Biol.* 14: 179-186
 WILLIAMS, J.A. and NICKOL, B.B.- 1989. *J.Fish Biol.* 35: 359-372

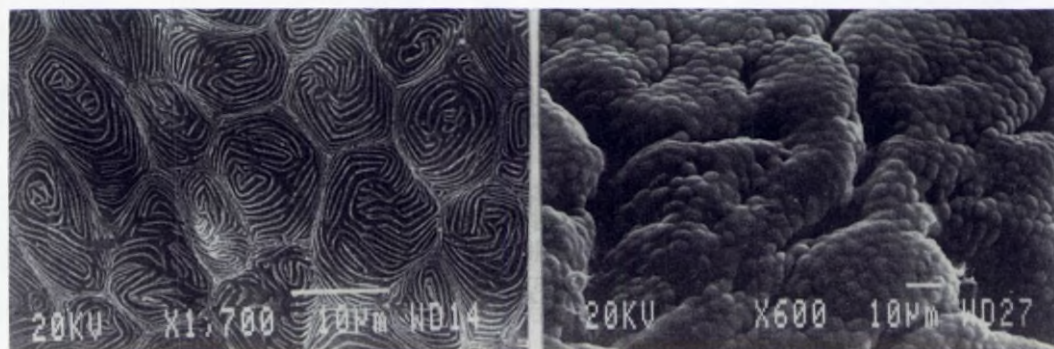


Fig. 1. MEB de la mucosa del esófago donde se observan repliegues primarios longitudinales y transversales.

Fig. 2. MEB de la mucosa del estómago. Entre las células epiteliales se observan foveolas gástricas y secreciones mucosas.

MIELINIZACION EN EL NERVIIO OPTICO DE RATAS CRIADAS EN CONDICIONES DE OSCURIDAD ABSOLUTA.

González-Valverde, P; Mompeó Corredera, B; Sánchez Salgado, G;
Salas Garvín, G. y Pizarro Celis, C.

PATOLOGIA Y CLINICAS HUMANAS

FACULTAD DE MEDICINA. Universidad de Extremadura

Introducción:

La mielogénesis puede ser modificada por la acción de factores externos entre los que se han descrito los nutricionales (1) y los lumínicos (2,3), o internos como los hormonales (1).

Los objetivos de nuestro estudio se han centrado en establecer una serie de parámetros en torno al inicio y evolución del proceso de mielogénesis en condiciones de oscuridad. Se analiza el comportamiento de la población glial, el nº de axones que mieliniza, el grosor de la cubierta mielínica y su correlación con el diámetro del axón y finalmente el diámetro total de las fibras nerviosas.

Material y Métodos:

Se han utilizado nervios ópticos de ratas, de diferentes edades, a las que se ha mantenido en condiciones de oscuridad absoluta.

El procesamiento de las muestras se realizó siguiendo la pauta habitual para M.E.T.

El cálculo de los distintos parámetros cuantificados se realizó mediante un analizador de imagen A.M.S. VID-II.

Resultados y Discusión:

Nuestras observaciones han mostrado que en el nervio óptico de ratas criadas en condiciones normales la mielinización se inicia el día 8 de vida postnatal, de acuerdo con los resultados de otros autores (4,5), mientras que en los animales sometidos durante su desarrollo a oscuridad absoluta tiene lugar un día antes.

La población glial de los animales sometidos a oscuridad es inferior a la de los controles durante los primeros 25 días de vida postnatal.

La actividad de los oligodendrocitos se incrementa entre los 6 y los 10 días originando un número mayor de axones mielinizados.

La falta del estímulo luminoso, que en condiciones normales se transmite a través de los párpados, podría en los animales experimentales estimular la actividad de los oligodendrocitos y como resultado adelantarse la

mielogénesis aun existiendo menor número de células gliales. La causa del estímulo bien pudiera ser de origen neuronal o como interacción neurona-glia de acuerdo con Kan y Lister (1985).

La determinación del grosor medio de la cubierta mielínica ha sido utilizado por la mayoría de los autores, sin embargo consideramos que este parámetro está sujeto a grandes variaciones por la amplia gama de tamaños que presentan los axones y sus envueltas.

Esta misma característica se observó en cuanto al diámetro de las fibras. El diámetro de las fibras nerviosas no presentan a los 15 días diferencias llamativas entre ambas poblaciones, pero en los experimentales el número de fibras pequeñas es superior.

Bibliografía:

1. WIGGINS, R.C. y Cols., (1984). Brain. Research. 308:263-272.
2. TAUBER, H. y Cols., (1980). Neurosci. Lett. 16:235-238.
3. WARD, R. y Cols., (1982). J. Hirnforsch. 23:311-313.
4. GONZALEZ-VALVERDE, P. y Cols., (1979). Anal. Anta. 28(75):565-576.
5. CUENCA, N.E. y Cols., (1987). J. Comp. Neurol. 263:613-617.
6. KAN, F. y Cols., (1985). Neurosci. Lett. 59:111-116.

inmaduros, la matriz es electron clara y muestra una subestructura fibrilar; durante el proceso de maduración, su densidad aumenta y su aspecto es granular.

Otras inclusiones importantes en el oocito son los gránulos corticales que en este momento del desarrollo, ocupan posiciones periféricas, por debajo del oolema.

La vesícula germinal ocupa gran parte del oocito, presenta un nucleolo prominente y numerosos poros en su envuelta nuclear. El nucleoplasma tiene un aspecto claro.

En el oolema aparecen esporádicamente, no como un hecho importante, vesículas forradas de micropinocitosis.

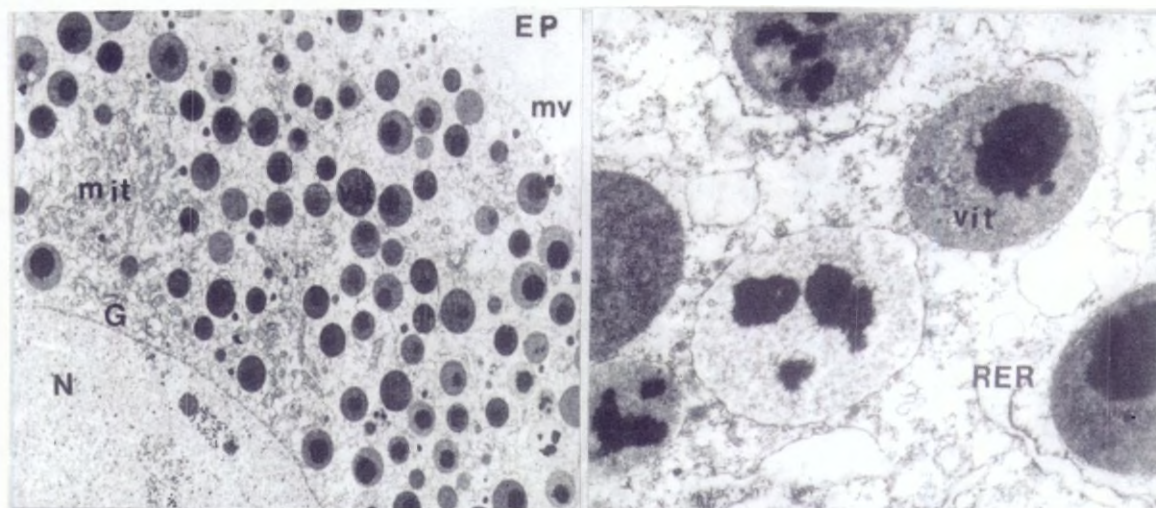
En este estudio se han hecho descripciones de los gránulos de vitelo en el oocito de Glossobalanus minutus en sus diferentes grados de maduración, así como de los gránulos corticales que tendrán un papel importante en la reacción cortical del oocito frente a la entrada del espermatozoide en el proceso de la fecundación. Estos gránulos corticales no presentan una subestructura membranosa en su interior como ocurre en algunas especies de Equinodermos.

Bibliografía: ADIYODI, K.G. y ADIYODI, R.G., eds. (1983). Reproductive Biology of Invertebrates.

Vol. II: Oogenesis, Oviposition and Oosorption. Chichester, Sussex: John Wiley & Sons Ltd.

GURAYA, S.S. (1986). Morphological Studies on the Gonads and Gametogenesis in the Hemichordate Ptychodera flava. Z. mikrosk. anat. Forsch., Leipzig 100, 5, s.: 711-728.

HADFIELD, M.G. (1975). Hemichordata. En: "Reproduction of Marine Invertebrates. Vol. II: Entoprocts and Lesser Coelomates. A.C. Giese y J.S. Pearse. Capt. 7. New York. Academic Press.



ULTRAESTRUCTURA DEL OOCITO VITELOGENICO DE Glossobalanus minutus(KOW.)

Carmen Guillén y Jesús Benito.

Departamento de Biología Animal I (Zoología).

Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid.

Introducción: Hasta el momento, los estudios realizados sobre las gónadas de los Hemicordados se limitan a los trabajos de Hadfield(1975) sobre los cambios periódicos en el sistema reproductor y, los realizados a microscopía lumínica sobre las gónadas y gametogénesis en Ptychodera flava(Guraya, 1986). Nuestro estudio trata de la ultraestructura del oocito vitelogenico en el interior del saco ovárico de Glossobalanus minutus.

Material y Métodos: Se han utilizado individuos adultos de Glossobalanus minutus, recogidos en la zona intermareal de Panjón(Pontevedra). Los segmentos de su región branquiogenital fueron fijados en glutaraldehído al 4% y postfijados en tetróxido de osmio al 1%. Las piezas de tejido fueron deshidratadas en acetona, teñidas en bloque con acetato de uranilo al 2% e incluidas en Araldita. Los cortes finos se obtuvieron en un ultramicrotomo LKB III y se tiñeron con citrato de plomo.

Resultados y Discusión: En este estadio de la oogénesis, el oocito se encuentra rodeado de un amplio espacio perivitelino donde se proyectan numerosas microvellosidades. Las microvellosidades, en su interior, contienen un haz de microfilamentos paralelos con función de armazón.

Los gránulos de vitelo ocupan la mayor parte del citoplasma. Dichos gránulos muestran una estructura y densidad electrónica variables, consecuencia de los diferentes grados de maduración. Por lo general, los gránulos, rodeados de membrana, presentan una o varias condensaciones de material en una matriz de menor densidad electrónica. En los gránulos

ORGANIZACION DEL CITOESQUELETO DE LA CAVIDAD VESTIBULAR EN
Balantidium entozoon (PROTOZOA, CILIOPHORA)

Almudena Guinea, Ana Sola y Susana Serrano

Dpto. Microbiología I.

Fac. Biología. Univ. Complutense. 28040 Madrid.



Introducción: Los trabajos realizados sobre ciliados tricostomátidos durante las últimas décadas han sido escasos. Del género Balantidium, único género de la familia Balantiidae, se han descrito numerosas especies, pero son muy pocos los estudios referentes a su estructura y ultraestructura.

La estructura vestibular del género Balantidium únicamente ha sido estudiada en algunas especies: B. entozoon (1,3), B. elongatum (1,2,5), B. coli (1,5,9), B. xenopi (8), B. testudinis (6) y B. caviae (7). Por tanto, la estructura vestibular de B. entozoon ha sido sólo descrita a nivel óptico, por lo que hemos considerado interesante realizar su estudio con la ayuda de la microscopía electrónica de transmisión.

Material y Métodos: Los ejemplares de Balantidium entozoon fueron aislados del contenido intestinal de la cloaca de Rana ridibunda con la ayuda de una micropipeta, siendo el método de impregnación argéntica de Fernández-Galiano (4) el método utilizado en microscopía óptica. Para microscopía electrónica las células fueron fijadas en tetróxido de osmio en tampón cacodilato al 1%, deshidratadas gradualmente en acetona e incluidas en araldita. Los cortes se realizaron en un ultramicrotomo LKB, teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo y observados en un microscopio Philips 300.

Resultados y Discusión: Nuestras observaciones sobre la ultraestructura de la cavidad vestibular de Balantidium entozoon confirman el origen somático de las cinetias vestibulares en el género Balantidium (1,5), pero nuestros resultados indican que las cinetias supernumerarias únicamente estén presentes en la parte posterior del margen izquierdo.

Las monocinéticas del margen derecho del vestíbulo de B. entozoon conservan, como B. xenopi (8) y B. caviae (7), los derivados fibrilares clásicos de la infraciliación somática (fibra cinetodésmica, microtúbulos transversos y microtúbulos postciliares). La trayectoria de los nemadesmos del margen derecho de B. entozoon es semejante a la observada en B. elongatum (5) y en B. xenopi (8), mientras que en B. coli (5) y en B. testudinis (6) la trayectoria de estos microtúbulos es longitudinal. Las crestas intercinéticas de este margen están sostenidas por microtúbulos postciliares y transversos.

La ultraestructura del margen vestibular izquierdo no ha sido descrita en ninguna especie del género Balantidium. Los cinetosomas del margen vestibular izquierdo se observan más próximos entre sí que los del margen derecho, estableciéndose en cada cinetia uniones electrondensas a nivel de su extremo proximal. Las crestas intercinéticas de este margen están también sostenidas por los microtúbulos postciliares y transversos, pero en este margen las fibras cinetodésmicas son rudimentarias. Los microtúbulos transversos de los cinetosomas de este margen constituyen, como en B. xenopi (8) y en B. elongatum y B. coli (5), junto con los nemadesmos procedentes del margen derecho, el citoesqueleto dorsal de la cavidad vestibular.

Por último, las largas fibras periódicas de la parte posterior de la cavidad vestibular de B. entozoon, corresponden al "motorium" descrito en B. elongatum (2) y en B. entozoon y B. galianoi (3).

Bibliografía: (1) Fauré-Fremiet. 1955. J. Protozool., 2. (2) Fernández-Galiano. 1952. Trab. Inst. Cienc. Nat. "José Acosta", Ser. Biol., 4. (3) Fernández-Galiano. 1955. Trab. Inst. Cienc. Nat. "José Acosta". Ser. Biol., 4. (4) Fernández-Galiano. 1976. Trans. Am. Microsc. Soc., 95. (5) Grain. 1966. C.R. Acad. Sc. París, 263. (6) Grain. 1969. Progress in Protozoology, abstr. Third Int. Cong. on Protozool., Leningrad, Nauka ed. (7) Paulin y Krascheninnikow. 1973. Acta Protozool., 12. (8) Puytorac de y Grain. 1965. Protistologica, 1. (9) Wolska. 1963. Acta Protozool., 1.

ESTUDIO CON M.E.T. DE LOS ELEMENTOS PERITUBULARES DE LOS TESTICULOS CRIPTORQUIDICOS.

Gutierrez, A., Cañizares, FJ., Campos, A.

Departamento de Histología y Biología Celular. Facultad de Medicina. Universidad de Granada. 18071 Granada.

Introducción:

Diferentes estudios han mostrado que los testículos criptorquídicos presentan un patrón histológico, histométrico y ultraestructural característico (1, 2). De otra parte, se establece la importancia de la edad en la aparición de dichas alteraciones (3). El objetivo del presente trabajo es establecer las modificaciones ultraestructurales presentes en los testículos criptorquídicos en los distintos periodos cronológicos de la infancia.

Material y Métodos:

En el presente trabajo se estudia una serie de 19 testículos criptorquídicos procedentes de biopsias testiculares obtenidas en el momento de la orquidopexia. Dicho material fue procesado para microscopía electrónica de transmisión según las pautas metodológicas habituales. Los testículos se clasificaron cronológicamente según las etapas de la infancia, esto es de 0 a 1 años, de 2 a 4 años, de 5 a 9 años y de 10 a 14 años (1, 2).

Resultados y Discusión:

El estudio de los elementos peritubulares en los testículos criptorquídicos de los diferentes grupos cronológicos establecidos nos permite distinguir modificaciones significativas tanto a nivel de la lámina basal como de la túnica propia.

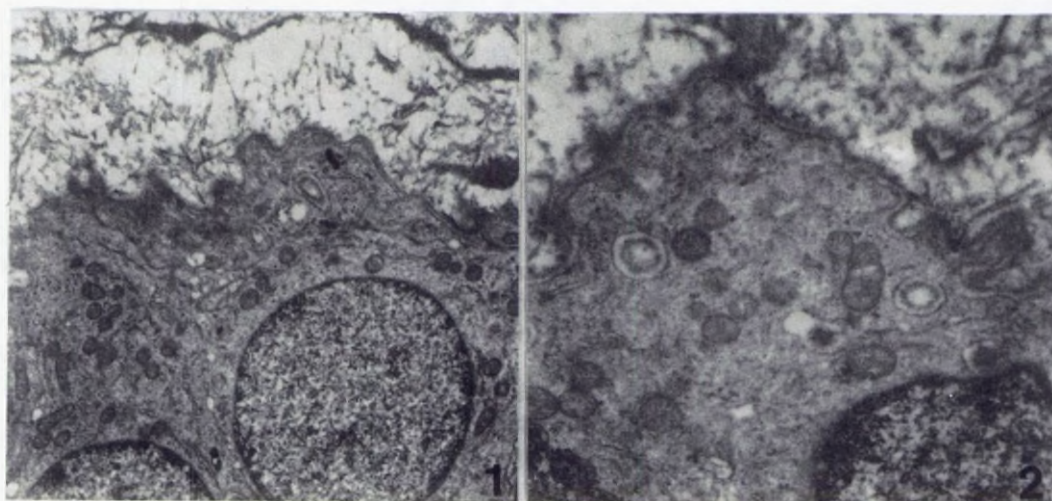
En relación con la lámina basal, destacamos el incremento progresivo de grosor en los grupos cronológicos de mayor edad al igual que se observa una continuidad de la misma a lo largo de toda la pared tubular en todos los grupos cronológicos considerados de la infancia (3). Asimismo, destaca en el grupo cronológico de 2 a 4 años la presencia de invaginaciones de la membrana basal, así como, el erizamiento de la superficie tubular, no siendo observada la misma en el resto de los grupos estudiados (Fig. 1 y 2).

La túnica propia de dichos testículos de 2 a 4 años presenta un incremento en la densidad y tamaño de la capa de fibras de colágeno, con respecto al período anterior, y superior también respecto a los periodos posteriores. Finalmente observamos un descenso en el número de elementos fibroblásticos en los grupos cronológicos de mayor edad.

Las modificaciones encontradas, que se relacionan con la actividad biosintética del colágeno, sugieren una interacción entre estos y el desarrollo de la línea germinal en los testículos criptorquídicos.

Bibliografía:

- 1) **Bacon, R. and Niles, R.** (1985). Springer-Verlag, New York., pp. 395-420.
- 2) **Glenn, J.** (1986). Davis Christopher. Interamericana, México, pp. 1761-1821.
- 3) **Hadziselimovic, F.** (1977). Advances in Anatomy, Embriology and Cell Biology. Springer-Verlag, Vol 53, pp. 1-72.
- 4) **Lopez, A., Vilches, J., Aparicio, J. y Castiñeiras, J.** (1987). Acta Urol. Esp., 11, 23-28.



NUEVO METODO DE DETECCION ANTIGENICA POR INMUNOADHERENCIA A S.AUREUS INMUNOMARCADO Y ANALISIS POR ELECTRONES RETRODISPERSADOS

Herrera M.I., Cuevas L., Santa María I., Cantó C., Pérez-Breña P.
y Katz D.*

Centro Nacional de Biología Celular y Retrovirus. Centro Nacional de Microbiología. Majadahonda (Madrid). *Israel Institute for Biological Research. Ness Ziona. Israel.

Introducción: Nuestro estudio se ha orientado hacia el desarrollo de una nueva metodología diagnóstica en virología, para la detección de virus o antígenos víricos en suspensión basada en la combinación de técnicas de inmunomicroscopía electrónica de adsorción a una fase sólida (ISEM) (1) con el inmunomarcado con oro coloidal, analizando las muestras por detección de electrones retrodispersados (ER) en un microscopio electrónico de barrido a 120 kV (MEB-ER), comparando resultados con los obtenidos por microscopía electrónica de transmisión (MET) y tomando como área de aplicación enfermedades respiratorias (producidas por el virus Respiratorio Sincitial, RSV), y el SIDA (por el virus de la Inmunodeficiencia humana, VIH). La aplicación reciente (2) de la MEB-ER a la localización de antígenos víricos en células infectadas por VIH ha mostrado las ventajas de este sistema en la detección sensible y específica de antígenos y su ulterior cuantificación.

Material y Métodos: El método desarrollado se basa en la técnica "Protein A-coated bacteria technique" (PA-CBT) (3) que utiliza la bacteria que contiene la proteína A (*Staphylococcus aureus*, cepa Cowan I) como fase sólida para la captura de virus en suspensión, en dos etapas: una primera incubación de las bacterias con anticuerpos específicos frente al virus problema, (anticuerpos de captura, AC) y una segunda incubación con la muestra a estudiar, visualizándose las preparaciones por tinción negativa (TN) y MET. En nuestro trabajo, se ha procedido al posterior inmunomarcado indirecto de las muestras con anticuerpos monoclonales (MAbs) y oro coloidal (PA-CBT/oro), empleando alternativamente MET y MEB-ER para su estudio, ensayándose: 1) En RSV, sobre cultivos de virus y secreciones nasofaríngeas y 2) En VIH, sobre cultivos de virus y en 20 sueros de individuos seropositivos, empleándose en ambos ensayos antisueros humanos como AC y MAbs en el inmunomarcado.

Resultados y Discusión: A diferencia de la PA-CBT, esta nueva técnica permite la detección de antígenos solubles en sueros y en muestras clínicas, debido al procedimiento de inmunomarcado con oro coloidal. Una vez marcadas, las muestras pueden estudiarse opcionalmente por MET o por MEB-ER. Este último método posibilita la visualización del marcador (oro coloidal) en la superficie de bacterias aisladas y también en agregados (que interferían al visualizar por tinción negativa).

En los estudios sobre RSV se ha observado que la MET directa proporciona resultados satisfactorios, dado que la concentración de antígenos víricos presentes en las muestras clínicas fue suficiente para su visualización por MET (Fig.1), sin que fuera preciso recurrir a la mayor sensibilidad de la MEB-ER.

En la detección del antígeno p24 del VIH la MEB-ER proporciona una sensibilidad mayor que la MET, siendo posible detectar 125 pg/ml de antígeno diluido en PBS y 150 pg/ml de antígeno diluido en suero humano, con un límite de detección en sueros humanos positivos por ELISA de 420 pg/ml (Fig.2).

Estos últimos resultados muestran que el estudio de sueros plantea, al menos, de clases diferentes de problemas: a) Una disminución de la sensibilidad debida a una inhibición en la detección del antígeno (por causas en fase de estudio, p.e. sueros no clarificados) y b) una disminución de la sensibilidad debida a la elución del anticuerpo de captura (por competición con las IgGs humanas no específicas). Como solución a estos problemas, se procedió a reemplazar las suspensiones de bacterias comerciales (prefijadas en formalina) por suspensiones de bacterias sin fijar, por su mayor capacidad de unión a los anticuerpos de captura y a la fijación química con glutaraldehído de la unión bacteria-anticuerpos de captura con objeto de obtener una fase sólida más estable impidiendo la elución de estos anticuerpos.

Pese a la adopción de estas medidas, la sensibilidad de la PA-CBT/oro para antígeno diluido en PBS (125 pg/ml), ha sido aproximadamente el cuádruple de la obtenida en sueros (420 pg/ml). Es preciso, por tanto, mejorar el tratamiento previo de los sueros para obtener resultados más reproducibles y alcanzar la alta sensibilidad potencial de esta técnica.

El conjunto de los resultados pone de manifiesto las prometedoras posibilidades de aplicación de esta técnica en la detección de antígenos víricos en cualquier clase de muestras clínicas, como exudados y otros tipos de secreciones corporales, en los que por sus características se hace difícil la aplicación de otros métodos.

Bibliografía:

1. D. Katz y A. Kohn. "Immunosorbent electron microscopy for detection of viruses" *Adv. Virus Res.* 29: 169-194, 1984.
2. M.I. Herrera, I. Santa María, R. de Andres, R. Nájera. "Localization of Human Immunodeficiency Virus antigens in infected cells by scanning/transmission-immunogold techniques". *Ultrastruct Pathol*, 12:439-447, 1988.
3. D. Katz, Y. Straussman, A. Shahar, A. Kohn. "Solid-phase immune electron microscopy (SPIEM) for rapid viral diagnosis" *J. Immunol. Methods* 38: 171-174, 1980.



Fig. 1. X 34.000. M.E.T.

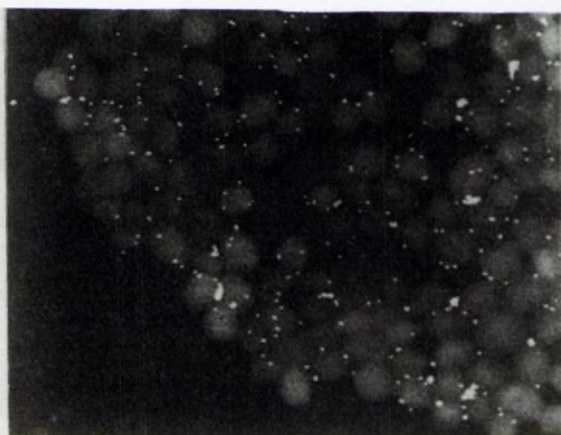


Fig. 2. X 7.000. M.E.B./E.R.

TECNICA DE PREPARACION DE MUESTRAS BIOLOGICAS DE GRAN TAMAÑO. ($\pm 1\text{cm}$)

J. Lebrato, R. Ocete Rubio, A.M. Jiménez, P.M. Escolar, E. Gómez Asensio

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, Apdo. 1052, 41080 Sevilla

Introducción:

El gusano rosado del algodnero, Pectinophora gossypiella Saunder (Lepidoptera: Pectinophoridae), es un microlepidóptero que constituye una de las principales plagas del algodnero en la práctica totalidad de los países productores.

Dentro de Andalucía Occidental existen áreas donde la especie puede considerarse endémica, como es el caso de la Zona Regable del Guadalquivir (Cádiz), en las que las larvas de esta especie provocan importantes daños cuantitativos y cualitativos que afectan seriamente al rendimiento económico de las explotaciones.

Para realizar la diagnosis se ha recurrido al empleo del microscopio electrónico de barrido.

Materiales y Métodos:

Las muestras se fijaron in vivo manteniéndolas en una solución 2:1 de Tetróxido de osmio glutaraldehído durante 24 horas.

Una vez fijados la deshidratación se realizó sometiéndolos a tratamientos con acetona de concentraciones del 25%-50%-75% en barridos sucesivos durante 15' permaneciendo en acetona al 75% hasta que se va a llevar al microscopio, que se le cambia por acetona al 100% durante 15'.

A continuación la muestra se pone en un porta, pegándolas con carbón coloidal y se observan al microscopio marca ISI modelo SS40 a una tensión de 2 Kv.

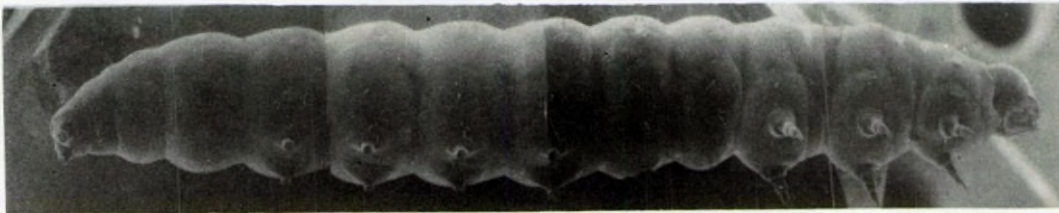
Materiales y Discusión:

Dentro del campo de la Entomología Aplicada, la técnica presentada permite un amplio conocimiento de la morfoanatomía de los estadios preimaginales, que es la base para la realización de una adecuada diagnosis de los mismos, que facilite la identificación inequívoca de las especies-plaga. Ya que ello constituye el punto de partida para el despliegue de medidas de control.

Bibliografía

ROOMANS, G.M., SHELBURNE, J.D. (1983). Basic Methods in Biological X-Ray microanalysis
Published By Scanning Electron microscopy O'hare (USA).

GOLDSTEIN, J.I., NEWBURY, D.E., ECHLIN, P., JOY, D.C., FIORI, CH., LIFSHIN, E. (1984)
Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis. Plenum Press. New York.



RESPUESTA DEL COMPLEJO LISOSOMICO DE LAS CELULAS DEL SINUSOIDE HEPATICO TRAS LA ADMINISTRACION DE CITRATO FERRICO.

LOPEZ, A; VAZQUEZ, S.; VILCHES, J.; MUÑOZ, C.; ROMERO, L.

to. de Biología Celular y Anatomía Patológica. Facultad de Medicina. Universidad de Cádiz.

ducción:

Los dos compartimentos celulares hepatocitarios -los elementos parenquimatosos y sinusoidales- se complementan ante la sobrecarga férrica. Sin embargo sigue existiendo una amplia controversia acerca del papel desempeñado por cada uno de los elementos sinusoidales en el metabolismo férrico. Las células de Kupffer son capaces de almacenar este elemento y en situaciones de demanda devolverlo al torrente sanguíneo. Por el contrario, las células endoteliales y de Ito, en condiciones normales, no participan en dicho metabolismo férrico, si bien en estados de sobrecarga se han observado depósitos en las células endoteliales (HULTCRANZ). Aún más discutida es la participación de las células perisinusoidales. El presente trabajo tiene como objetivos la distribución intracelular del hierro en las diferentes células del sinusoide hepático, los organelos celulares implicados y la cuantificación de las modificaciones inducidas experimentalmente.

Material y Métodos:

Se han utilizado un total de 20 ratas adultas de ambos sexos de 200 ± 20 gramos de peso a las que se les inyectó -vía intraperitoneal-, con una frecuencia semanal, citrato férrico amónico (60 mg/kg). Los animales se sacrificaron a los 15, 30 y 60 días. El número de animales sacrificados en cada fecha fue de cinco. Se utilizaron como control cinco animales a los que se les inyectó intraperitonealmente el mismo volumen que a los anteriores de agua estéril apirógena. El tejido procesado tras la fijación-perfusión con glutaraldehído al 2,5 % fue el convencional para M.E.. Los cortes se examinaron en un M.E.T. Philips 400. El estudio microanalítico se realizó sobre secciones de contraste de 1000 a 2000 Å que se montaron indistintamente en rejillas de Au y Ni. El analizador fue un EDAX 711; el tiempo de análisis de 200 segundos y a 20-40 Kv. Finalmente el estudio morfométrico se llevó a cabo sobre fotografías ultraestructurales de aquellos elementos que cumplían las pautas dictadas por H. DAVID, con un analizador VIDS-II y con un programa de fracción de área.

Resultados y Discusión:

Las células de Kupffer triplican su superficie debido, fundamentalmente, al enorme incremento que sufre el compartimento lisosómico que de $0,339 \text{ micras}^2$ pasa a las $21,385 \text{ micras}^2$ a los 60 días. Las células endoteliales, sin incrementar su superficie, sí se cargan de partículas férricas y sus lisosomas, que representan una fracción de área de 0,45%, llegan a ocupar el 7,3% de la superficie celular. Por último, las células de Ito captan partículas férricas -esto de manifiesto mediante microanálisis de rayos X-, incrementando, igualmente, su compartimento lisosómico hasta un 8,86% de su superficie celular. Prácticamente se admite que tanto los hepatocitos como las células de Kupffer son los elementos más representativos en el metabolismo férrico, tanto en condiciones normales como en estado de sobrecarga. Por el contrario existen diversas opiniones acerca de la participación de las células endoteliales. Por un lado HULTCRANZ y NOOK no la involucran en diversos estudios experimentales mientras que DULLMANN sostiene la tesis contraria. La discusión es mayor cuando se trata de las células de Ito, donde la mayoría de los estudios de siderosis no la consideran en los escasos que la citan para unos no intervienen

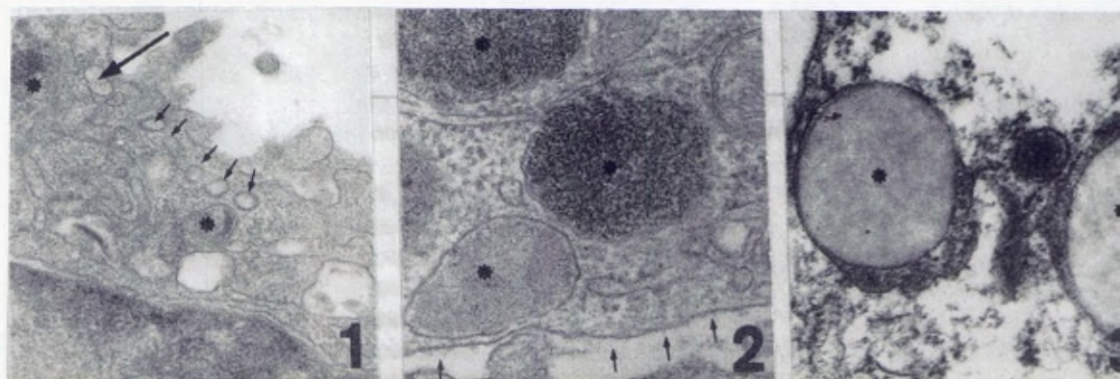
(HULTCRANTZ) mientras que para otros sí (VILCHES). Nuestros hallazgos confirman la participación de ambas células y los estudios microanalíticos aclaran la identidad de los depósitos electrodensos intralisosómicos observados tanto en las células endoteliales como en las de Ito.

	KUPFFER			ENDOTELIAL			ITO		
	AREA CEL.	LISOSOMA		AREA CEL.	LISOSOMA		AREA CEL.	LISOSOMA	
		AREA	FRAC.		AREA	FRAC.		AREA	FRAC.
CONTROL	20.586	0,339	1,65	13.833	0,089	0,45	26.858	0,225	0,8
15 DIAS	42.812	6,267	14,64	19.351	0,628	3,25			
30 DIAS	66.957	17,28	25,87	17.581	1,154	6,57			
60 DIAS	69.901	21,38	30,58	13.238	0,96	7,3	19.577	1,734	8,86

TABLA I: Valores morfométricos obtenidos en el transcurso de la sobrecarga férrica. Las cifras son en micras² y los porcentajes de la fracción de área ocupada por el compartimento lisosómico en %.

Bibliografía

DAVID, H. y cols. *Exp. Pathol.* 1983; 23; 131-141.
DULLMANN y cols. *Verh. Anat. Ges.* 1976; 70; 971-976.
HULTCRANTZ, R. y cols. *Amer. J. Pathol.* 1979; 96; 625-640.
VILCHES y cols. *Annales d'Anat. Pathol.* 1980; 25; 95-110.



Nº 1. Célula de Kupffer con numerosas estructuras endocíticas (1) y lisosomas (*) con contenido electrodenso. **Nº 2.** Célula endotelial con abundantes estructuras lisosómicas (*). Espacio de Disse (*). **Nº 3.** Células de Ito con liposomas (*). El microanálisis de las zonas electrodensas muestra picos férricos.

RESPUESTA DEL COMPLEJO LISOSOMICO HEPATOCITARIO TRAS LA MINISTRACION DE CITRATO FERRICO.

LOPEZ, A.; VAZQUEZ, S.; VILCHES, J.; DE PALACIO, L.; APARICIO, J.
to. de Biología Celular y Anatomía Patológica. Facultad de Medicina. Universidad de Cádiz.

RODUCCION: Las células parenquimatosas hepáticas así como las sinusoidales, participan en el cese de almacenamiento férrico. Los dos sistemas celulares se complementan uno en otro y son capaces de acumular cantidades masivas de hierro sin permitir su pase a otros órganos. Se sabe que el hierro intracitoplásmico se localiza, tanto a nivel del hialoplasma como en el interior de la red cavitaria, desconociéndose el mecanismo de intercambio de las partículas férricas entre estos dos compartimentos. Debido entre otros casos a las dificultades para la identificación de las partículas férricas con M.E.T. convencional, puesto que puede confundirse con otras partículas electrodensas, no afirma ARSTILA. En la presente trabajo estudiaremos las modificaciones ultraestructurales que se producen en los hepatocitos tras la sobrecarga férrica experimental; el reconocimiento de las partículas férricas mediante el análisis con energía dispersiva de rayos X de los diferentes organelos implicados en la distribución y almacenamiento del hierro y el estudio cuantitativo mediante un analizador VIDS-II la participación de los hepatocitos en la sobrecarga.

TERIAL Y METODO: Se han utilizado un total de 20 ratas adultas de ambos sexos de 200 ± 20 g de peso a las que se les inyectó -vía intraperitoneal-, con una frecuencia semanal, citrato férrico amonico (60 mg/kg). Los animales se sacrificaron a los 15, 30 y 60 días. El número de animales sacrificados en cada fecha fue de cinco. Se utilizaron como control cinco animales a los que se les inyectó intraperitonealmente el mismo volumen que a los anteriores de agua esteril apirógena. El procesamiento tras la fijación-perfusión con glutaraldehído al 2,5 % fue el convencional para M.E.. Los cortes se examinaron en un M.E.T. Philips 400. El estudio microanalítico se realizó sobre secciones ultraestructurales de 1000 a 2000 Å que se montaron indistintamente en rejillas de Au y Ni. El analizador utilizado fue un EDAX 711; el tiempo de análisis de 200 segundos y a 20-40 Kv. Finalmente el estudio morfométrico se llevó a cabo sobre fotografías ultraestructurales de aquellos elementos que cumplieran las pautas dictadas por H. DAVID, con un analizador VIDS-II y con un programa de fracción de área.

SULTADOS Y DISCUSION: El hierro administrado en primera instancia, es relativamente inocuo para los hepatocitos ya que es captado y almacenado por las células de la barrera sinusoidal. Cuando se produce la sobrecarga, nos encontramos como, desde un punto de vista ultraestructural, microanalítico y morfométrico, el compartimento lisosómico se incrementa en número, tamaño y actividad. Este hecho demuestra el papel defensivo de las células sinusoidales durante la sobrecarga férrica, debido a su capacidad de captación y almacenamiento. Sin embargo, cuando el hierro sobrepasa la capacidad de almacenamiento en los hepatocitos, las lesiones en estos últimos van a ser más intensas que en los elementos sinusoidales. Por otro lado, los hallazgos microanalíticos a nivel del canalículo biliar, suponen la existencia de una vía exocítica de excreción lisosómica de los compuestos férricos, estando estos

resultados en la misma línea de LESAGE y cols. que consideran la excreción biliar del hierro una vía importante para eliminar el exceso de este metal.

Las alteraciones del resto de los organelos celulares -mitocondrias, peroxisomas, etc.- sugieren un mecanismo de respuesta celular inespecífico, debido a las alteraciones del metabolismo lipoproteico sin que hasta el presente sea posible asignarle una significación exacta.

	CONTROL	15 DIAS	30 DIAS	60 DIAS
AREA CELULAR	161,20	260,168	283,703	142,136
LISOSOMAS	2.435	5.586	12.946	19.604
FA/L	1,51%	2,15%	4,56%	13,79%

TABLA I: Area en Micras; FA: Fracción de área; L: Lisosoma.

BIBLIOGRAFIA:

ARSTILA A.V. Y COLS. *Amer. J. Pathol.* 1970; 58; 419-449

DAVID H. y Cols. *Exp. Pathol.* 1983, 23; 131-134

LESAGE G.D. y Cols. *J. Clin. Invest.* 1986; 77; 90-97

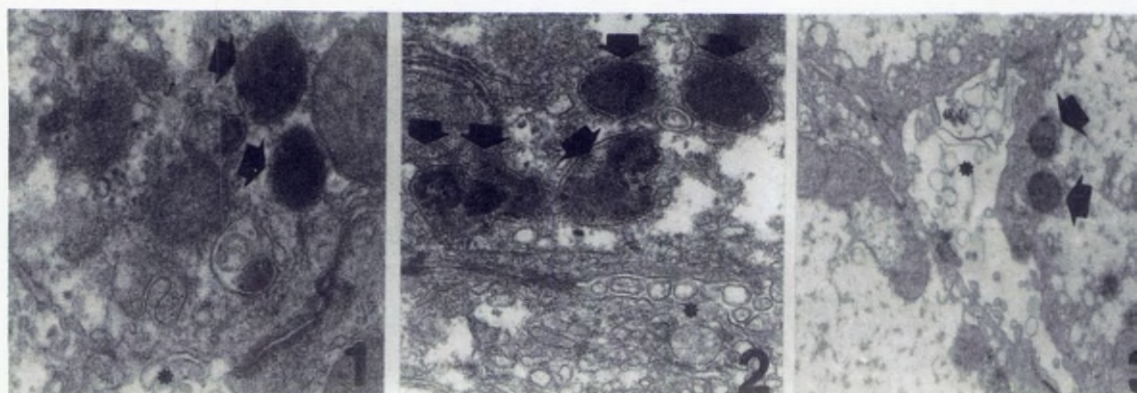


Fig. 1, 2, 3. Polo biliar hepatocitario con abundantes lisosomas (↑) en la Nº 3, en el canálculo biliar (*) existen partículas densas que microanalíticamente corresponden a hierro.

STRUCTURA Y FUNCIÓN DE LOS ÓRGANOS DE COMUNICACIÓN INTERZOOIDAL EN BRIOZOOS QUEILOSTOMADOS (BRYOZOA: EURYSTOMATA)

Carlos M^a López de la Cuadra y José Carlos García Gómez

LABORATORIO DE BIOLOGÍA MARINA.

Departamento de Fisiología y Biología Animal.

Facultad de Biología. Universidad de Sevilla.

Introducción:

Los briozoos son los únicos organismos coloniales que poseen, en la mayoría de las especies, exoesqueleto calcáreo (Jackson, 1977). En el orden Cheilostomata, la solución de dos problemas (gemación y comunicación), se consigue mediante las mismas estructuras, cuya función es en principio la gemación y después la comunicación. Lidgard (1985) reconoce dos tipos de gemación, cuyas combinaciones y modalidades explican las distintas geometrías coloniales existentes, tanto en especies incrustantes como erectas. Mostramos, con varios ejemplos, los tipos de gemación y de geometría colonial, basándonos en las modalidades de órganos de gemación-comunicación.

Material y Métodos:

Las colonias utilizadas eran desprovistas de materia orgánica mediante lavado en NaOCl, para poner de manifiesto exclusivamente el esqueleto calcáreo. Posteriormente fueron metalizadas con oro y observadas y fotografiadas con el microscopio electrónico de barrido JEOL 820 del Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Cádiz.

Resultados y Discusión:

g. 1.- Puellina innominata. Gemación intrazooideal. Una parte de la cavidad del zooide gemantese separa por una pared perforada interna, y la cámara resultante (cámara porosa)(flecha), produce hacia el exterior la cavidad del nuevo zooide, pasando a formar parte de éste, en un proceso de gemación intrazooideal. Las yemas varios zooides se unen para formar uno nuevo (geometría coalescente) sin que ninguno de ellos tenga una mayor influencia.

g. 2.- Chorizopora brongniartii Gemación zooideal con zooides disjuntos. Cada zooide produce túbulos cortos, que se fusionan cuando entran en contacto produciendo un nuevo zooide. La geometría resultante es coalescente.

g. 3.- Watersipora subovoidea crece en líneas paralelas (geometría lineal altiserial. La gemación se produce cuando la pared aún no se ha calcificado (gemación zooideal). Al formarse el tabique, quedan placas porosas de comuni-

cación, tanto en las paredes transversales (pt) como laterales (pl). La polaridad de las placas se indica con flechas.

Fig. 4.- *Schizomavella linearis* tiene una geometría semejante a la anterior, pero su gemación es multizooïdal, caso particular de la zooïdal en que la gemación se adelanta a la tabicación en sentido distal pero no lateral. En la zona de gemación sólo se forman paredes laterales, pero las transversales lo hacen muy por detrás. La comunicación se realiza por placas uniporosas (pu).

Fig. 5.- *Myriapora truncata*. Gemación zooïdal con geometría no lineal, en la que la zona de gemación (parte superior de la fotografía) está indiferenciada y no calcificada. Todas las paredes son tabiques internos que se forman con posterioridad a la gemación (Sandberg, 1977).

Fig. 6.- *Aetea sica*. Gemación zooïdal y colonia de tipo uniserial, en la que la parte proximal de cada zooïde es un túbulo. Los zooïdes no guardan contacto entre sí, excepto por el punto de gemación (p).

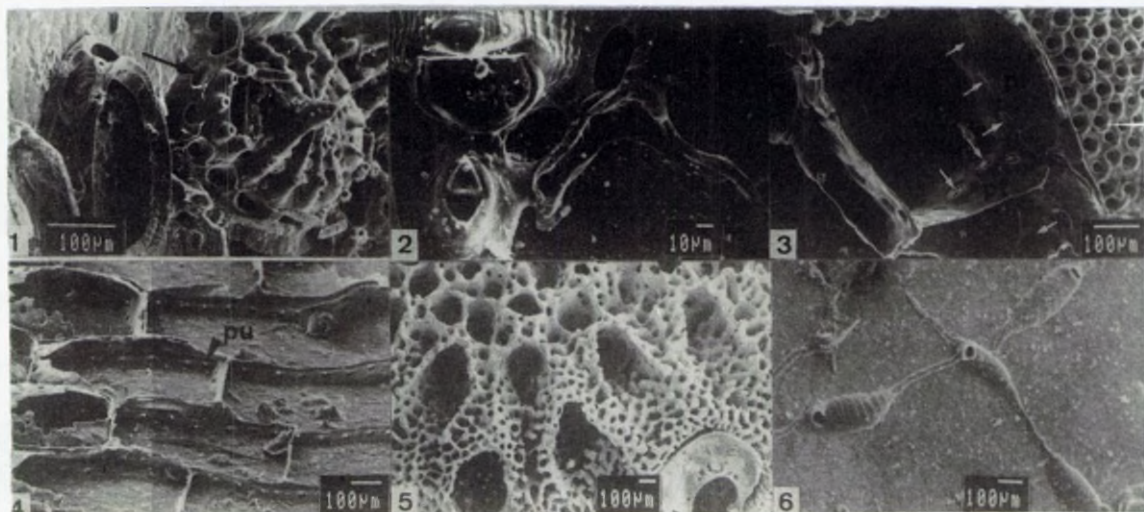
Los órganos de comunicación son "restos" del proceso de gemación, con el que están muy relacionados o del que son responsables, como en el caso de las cámaras porosas o la regeneración de un zooïde dañado, que se produce a partir de ellos (Banta, 1969).

Banta, W. C., 1969.- The body wall of cheilostome Bryozoa, II. Interzooïdal communication organs. *J. Morph.*, 125: 497-508.

JACKSON, J., 1977.- Competition on marine hard substrata: the adaptative significance of solitary and colonial strategies. *Amer. Natur.*, 111: 743-767.

JIDGARD, S., 1985.- Zooïd and colony growth in encrusting cheilostome bryozoans. *Palaeontology*, 28(2): 255-291.

SANDBERG, P. A., 1977.- Ultrastructure, mineralogy and development of bryozoan skeletons. En: R. M. Woolacott y R. L. Zimmer (eds.), *Biology of Bryozoans*. Academic Press.



EFFECTO DEL NITRATO SOBRE LA ULTRAESTRUCTURA DE LOS PEROXISOMAS Y LA LOCALIZACION DE CATALASA EN NODULOS DE *Lupinus albus* L. cv Multolupa.

LORENZO, C., LUCAS, M.M., VIVO, A., y de FELIPE, M.R.

FISIOLOGIA Y BIOQUIMICA VEGETAL

CENTRO DE CIENCIAS MEDIOAMBIENTALES, C.S.I.C., Madrid.

Introducción: La fijación biológica de nitrógeno en leguminosas se produce al establecerse una simbiosis entre la leguminosa y bacterias de los géneros (*Brady*)*rhizobium*. La simbiosis se traduce en la aparición de estructuras morfológicamente definidas (nódulos), en cuyo interior se encuentra el microsimbionte bacteriano. La aplicación de nitrato a una leguminosa con una nodulación bien establecida se traduce en una inhibición de la fijación y en severas alteraciones de la ultraestructura nodular.

En los últimos años se ha prestado gran atención al papel desempeñado por los peroxisomas en el funcionamiento de dichas simbiosis. En los nódulos de leguminosas se han encontrado dos tipos de peroxisomas. Esta es la primera vez que se describen los peroxisomas del nódulo de lupino, que constituyen un tercer tipo intermedio entre los citados, tanto por su aspecto y tamaño como por la localización de actividad catalasa en ellos.

Materiales y Métodos: Secciones de nódulos fijadas en glutaraldehído al 2.5 % en tampón fosfato 0.05 M pH 6.8 se preincubaron en DAB (3,3'-tetrahidroclorato de diaminobenzidina, Sigma) al 0.02 % en tampón 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol (AMPD, Sigma), 1 hora, en la oscuridad y a temperatura ambiente, según (1). A continuación las secciones se incubaron en el mismo medio con H_2O_2 0.02 %, 1 hora, en la oscuridad y a 37° C. En algunas muestras se adicionó 3-amino-1,2,4-triazol (AT, Sigma) 0.02 M, como inhibidor de la actividad catalasa. Tras la incubación las muestras se postfijaron en OsO_4 al 1 % en tampón fosfato, 1 hora a 4 °C. Se deshidrataron en serie creciente de acetona y se incluyeron en Araldita (Durcupan ACM). Las secciones ultrafinas se contrastaron con citrato de plomo (2) y se observaron en un microscopio electrónico Philips 300 a una tensión de 80 Kv.

Resultados y Discusión: El tejido central de los nódulos de leguminosas está compuesto, generalmente, de dos tipos de células: infectadas (en las que se encuentran los bacteroides o formas simbióticas de los *Rhizobium*), y no infectadas. En los nódulos de leguminosas que transportan el nitrógeno fijado en forma de amidas, las células no infectadas presentan el aspecto de una célula parenquimática normal (3). En los nódulos de las leguminosas que transportan el nitrógeno fijado en forma de ureidos (caso de la soja), los peroxisomas de las células no infectadas son grandes, están involucrados en el metabolismo de los ureidos y tienen actividad catalasa detectable mediante el marcado con diaminobenzidina (4). En ambos tipos de nódulos, los peroxisomas de las células infectadas son pequeños, de aspecto degenerado, y dan localización incierta o negativa de actividad catalasa.

El nódulo de lupino presenta la particularidad de que el tejido central está compuesto exclusivamente por células infectadas. Los peroxisomas encontrados en estas células (Fig.1) no presentan aspecto degenerado, son de tamaño intermedio (0 medio: 0.18-0.35 μm) entre los dos tipos anteriormente citados, y dan reacción claramente positiva con la DAB (Fig.2). Esta es la

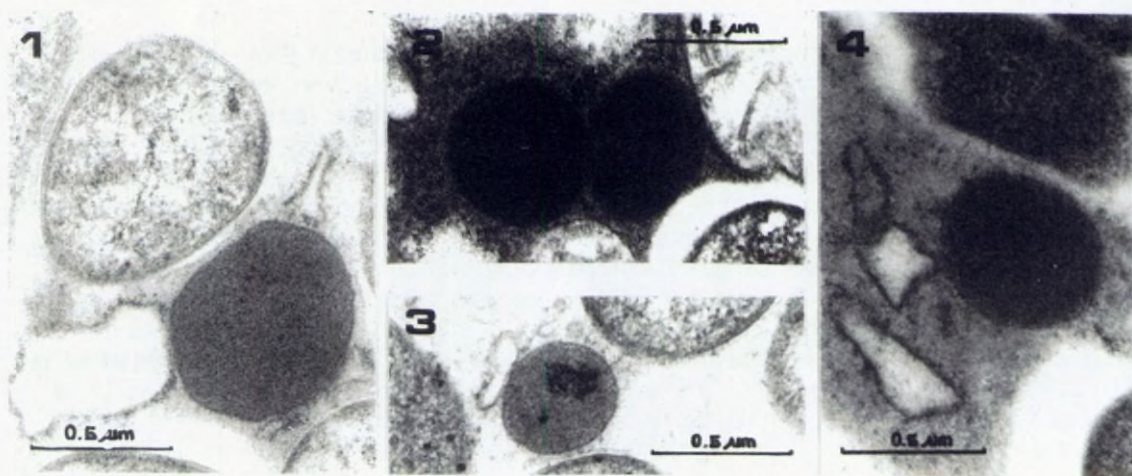
primera vez que se describen los peroxisomas del nódulo de lupino, y también la primera vez que peroxisomas de células nodulares infectadas presentan actividad catalasa localizable mediante DAB. En los bacteroides puede apreciarse la existencia de pequeños precipitados, posiblemente relacionados con la existencia en los mismos de actividad catalasa. El uso de AT como inhibidor de catalasa redujo el marcado de los peroxisomas (aunque aun son apreciables restos de reacción, Fig.3), sin que se apreciara diferencia en los bacteroides.

La aplicación de nitrato a las plantas noduladas de lupino (20 mM, durante 5 ó 10 días) se tradujo en una gran alteración de la ultraestructura de los peroxisomas y en una pérdida del marcado con DAB (Fig.4, 5 días de nitrato), indicativa de una disminución de actividad catalasa. No se apreciaron diferencias en los bacteroides. La actividad catalasa y la fijación de nitrógeno han sido correlacionadas positivamente (5). En nuestro caso, la pérdida del marcado con DAB fué paralela a una disminución de actividad nitrogenasa del 32 % y 70 %, respectivamente, tras 5 y 10 días de nitrato. Los resultados histoquímicos están de acuerdo con los obtenidos bioquímicamente (6), en los que el nitrato disminuye la actividad catalasa del citoplasma del nódulo pero no la de los bacteroides.

La disminución de las actividades nitrogenasa y catalasa, así como la reducción en el contenido en leghemoglobina (una de las proteínas claves en el proceso de fijación de nitrógeno) y la degradación estructural observada en los componentes nodulares (7), son indicadores de la senescencia inducida en el nódulo por la aplicación de nitrato a la leguminosa.

Bibliografía:

1. de Felipe, M.R., et al. *J. Plant Physiol.* **132**: 67-73. (1988).
2. Reynolds, E.S. *J. Cell Biol.* **17**: 208-213. (1963).
3. Vaughn, K.C., et al. *Histochemistry* **74**: 309-318. (1982).
4. Newcomb, E.H. et al. *Protoplasma* **125**: 1-12. (1985).
5. Francis, A.J. and Alexander, M. *Can. J. Microbiol.* **18**: 861-864. (1972).
6. Becana, M., et al. *Physiol. Plant.* **38**: 65-69. (1988).
7. Lorenzo, C. et al. *J. Exp. Bot.* **41** (en prensa). (1990).



"ESTUDIO INMUNOCITOQUIMICO ULTRAESTRUCTURAL DE LOS DIFERENTES TIPOS DE CELULAS ENDOCRINAS DE LOS ISLOTES DE LUBINA (Dicentrarchus labrax).

LOZANO, MT; GARCIA HERNANDEZ, MP; ABAD, ME; GARCIA AYALA; AGUILLEIRO, B.

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

FACULTAD DE BIOLOGIA. UNIVERSIDAD DE MURCIA. MURCIA

Introducción: En los islotes pancreáticos de lubina (D. labrax) se han identificado con la técnica inmunocitoquímica PAP, células con inmunoreactividad semejante a glucagón, insulina, somatostatina y polipéptido pancreático (Carrillo y cols, 1986). En estudios inmunocitoquímicos recientes (PAP e inmunofluorescencia), se ha demostrado la presencia de SST 14 y SST 25 en diferentes células endocrinas, así como de células que mostraban coexistencia de glucagón y PP/PYY (Lozano y cols, 1990a y b). En el presente trabajo se pretende caracterizar ultraestructuralmente dichas células endocrinas mediante técnicas ultraestructurales convencionales e IgG-oro.

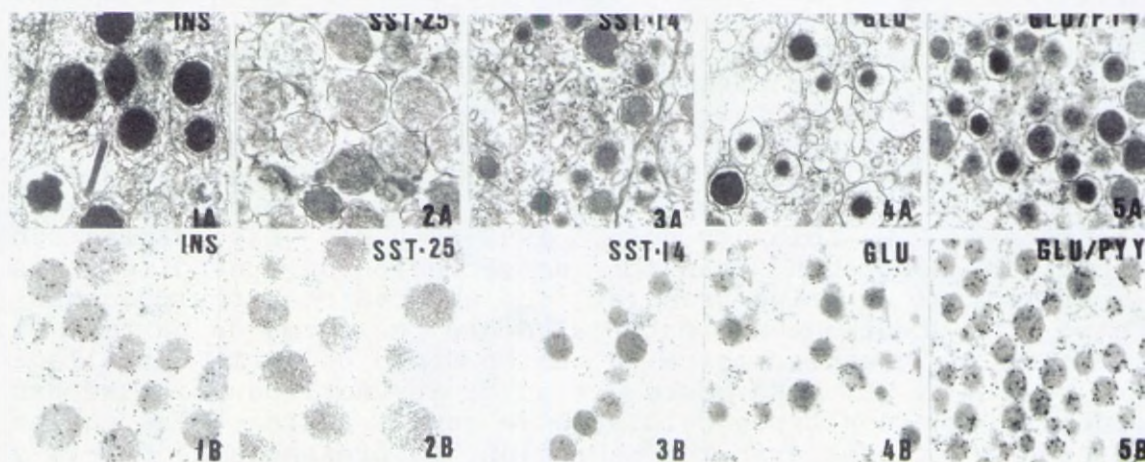
Material y Métodos: Se han utilizado ejemplares adultos de lubina de ambos sexos mantenidos en las instalaciones de la Planta Experimental de Cultivos Marinos de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia. Los islotes pancreáticos fueron procesados según las técnicas microscópico electrónicas convencionales e IgG-oro (Wang y Larsson, 1985; van Bergen en Henegouwen y Leunissen, 1986). Se utilizaron los siguientes primeros antisueros (y diluciones): insulina de bonito (1:500), glucagón de bonito (1:200), PP bovino (1:500), PYY sintético (1:500), SST 14 sintética (1:100), SST 25 de salmón (1:500). Como segundo anticuerpo se utilizó GAR-G10 (Janssen Biotech N.V.).

Resultados y Discusión: En el páncreas endocrino de lubina se han caracterizado ultraestructuralmente, con la técnica inmunocitoquímica IgG-oro, células con inmunoreactividad semejante a insulina, SST-14, SST-25, glucagón y células que muestran coexistencia de glucagón y PP/PYY, confirmándose los resultados previamente obtenidos con la técnica PAP (Lozano y cols, 1990 a y b). Las células con insulina mostraban gránulos de secreción de tres diferentes morfologías: un tipo granular con un centro esférico denso, otro tipo contiene un material denso en forma de barra y el tercer tipo granular posee un centro denso de forma estrellada (Figs 1A y B). En este estudio inmunocitoquímico se han identificado dos tipos celulares de somatostatina, las cuales poseen diferentes gránulos secreción. La presencia de SST-14 y SST-25 en diferentes células pancreáticas endocrinas había

sido descrita en los islotes de salmónidos (Nozaki y cols, 1988) y de dorada (Abad y cols, 1990). En lubina las células con SST-25 poseen gránulos de secreción de contenido finamente granular (Figs 2A y B), mientras que las células con SST-14 poseen gránulos de secreción de menor tamaño con un centro de moderada electronodensidad (Figs 3A y B). Las células con glucagón presentaban dos tipos granulares: gránulos tipo 1 que poseen un centro denso poligonal y gránulos tipo 2 que contienen un centro esférico denso (Figs 4A y B). En los islotes tipo I de lubina las células con coexistencia de glucagón y PP/PYY presentan sólo gránulos tipo 2 mientras que en los islotes tipo II se observaron células que contienen sólo gránulos tipo 1 y células que presentaban sólo gránulos de tipo 2 (Figs 5A y B). Células que muestran coexistencia para glucagón y PP habían sido descritas en los islotes secundarios de dorada (Abad y cols, 1988), siendo su contenido granular semejante al de los islotes tipo I de lubina, pero a diferencia de la dorada, en los islotes principales de lubina no se han encontrado células con sólo PP. El patrón de distribución de los distintos tipos celulares en los islotes, sugiere la existencia de un control paracrino recíproco entre las mismas.

Bibliografía:

- Abad, ME; Taverne-Thiele, JJ y Rombout, JHWM (1988). *Gen. Comp. Endocrinol.* 70: 9-19.
 Abad, ME; Garcia Ayala, A; Lozano, MT y Agulleiro, B (1990). *Gen. Comp. Endocrinol.* (En prensa).
 Carrillo, M; Zanuy, S; Duve, H y Thorpe, A (1986). *Gen. Comp. Endocrinol.* 61: 287-301.
 Lozano, MT; Garcia Ayala, A; Abad, ME y Agulleiro, B (1990A y B). *Gen. Comp. Endocrinol.* (En prensa).
 Nozaki, M; Miyata, K; Oota, Y; Gorbman, A y Plisetskaya, EM (1988). *Gen. Comp. Endocrinol.* (En prensa).
 van Bergen en Henegouwen, PMP y Leunissen, JLM (1986). *Histochemistry.* 85: 81-87.
 Wang, BL y Larsson, LI (1985). *Histochemistry.* 83: 47-53.



DISTINCION INMUNOLOGICA DE CEPAS DE *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) POR MEDIO DE M.E.

LUCAS M.M., A. VIVO y J.M. POZUELO.

FISIOLOGIA Y BIOQUIMICA VEGETAL.

CENTRO DE CIENCIAS MEDIOAMBIENTALES. C.S.I.C. Madrid.

Introducción: Las bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* fijan N_2 atmosférico en simbiosis con las leguminosas, en estructuras de las raíces morfológicamente definidas (nódulos). Con objeto de incrementar la producción de las leguminosas, es frecuente la inoculación de cepas altamente efectivas en la fijación. Estas cepas deben competir en la nodulación con las autóctonas, totalmente adaptadas al medio. En los estudios de competitividad es imprescindible disponer de técnicas para la identificación específica del microsimbionte en el nódulo de la leguminosa. Los métodos más empleados (resistencia a antibióticos, ELISA, inmunofluorescencia) no permiten el reconocimiento de las cepas a nivel de M.E. Mediante las técnicas inmunocitoquímicas esto es posible, y sin embargo su utilización hasta el momento no se ha descrito.

En este trabajo se identifican cepas de *B. sp. (Lupinus)* en cultivos celulares y en nódulos de *L. albus* L. cv Multolupa, empleando oro coloidal como inmunomarcador.

Material y Métodos: Muestras de nódulos de plantas de *Lupinus albus* L. cv Multolupa inoculadas con las cepas de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) ISLU 65 y/o Hig 5₂ e Hig 1₈₅ se fijaron en glutaraldehído 2,5% en tampón cacodilato-Na 0,05 M pH 7,4, 2h. Algunas se postfijaron en OsO_4 1%, 1 h. Todas las muestras se incluyeron en Araldita Durcupan ACM (1). Paralelamente se procesaron cultivos puros y mixtos de las cepas de *B. sp. (Lupinus)*. En rejillas de Ni de 400 ventanas se recogieron secciones de 700 Å de espesor. Las muestras osmificadas se trataron con metaperiodato-Na 0,56 M, 1 h (2). El inmunomarcado se llevó a cabo con 30-5 µg/ml de IgGs procedentes de sueros de conejos inmunizados con suspensiones celulares de *Bradyrhizobium*, y anticuerpos de cabra anti-conejo conjugados con Au coloidal de 15 nm de diámetro (Janssen), diluido 1/10. Las muestras se contrastaron con acetato de uranilo 2%, 10 min. y citrato de Pb, 2 min. (3)

Resultados y Discusión: La inclusión de las muestras en Araldita ha permitido la inmunoidentificación de cepas de *Bradyrhizobium*. El alto título de los antisueros (4), la abundancia de los antígenos en la bacteria y su termoestabilidad han hecho posible la utilización con éxito de un método convencional de inclusión.

La osmificación de las muestras y el posterior desenmascaramiento de los antígenos con metaperiodato sódico produjo disminución de la inmunoreactividad de los antígenos (Fig 1, 30 µg/ml IgG, x 20.500), respecto a las muestras no postfijadas con osmio (Fig. 2, 30 µg/ml IgG, x 21.000). Los antígenos somáticos de *Bradyrhizobium* están constituidos, principalmente, por lipopolisacáridos que podrían alterarse por el tratamiento empleado, ya que el metaperiodato afecta a los grupos glicosídicos (5). La concentración de 5 µg/ml de IgG resultó ser suficiente para obtener una buena inmunoreacción.

El inmunomarcador se situó en las membranas interna y externa de las paredes (P) de las bacterias, tanto en vida libre como en simbiosis, delimitando claramente el espacio periplásmico (EPP) en las zonas polares. En ocasiones se observó oro coloidal en el espacio peri-

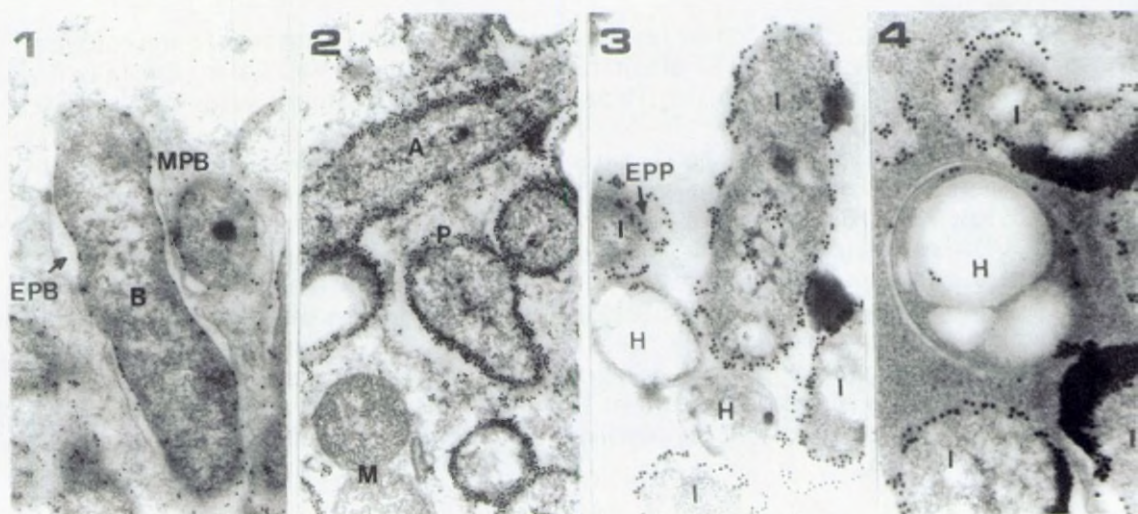
bacteroidal (EPB) sobre sustancias que parecían desprenderse de los bacteroides (formas simbióticas de las bacterias, B). También se localizó inmunomarcador sobre las microfibrillas de ADN (A). En las reacciones utilizando sueros heterólogos, el oro coloidal únicamente se situó sobre las microfibrillas de ADN, comprobándose la escasa relación serológica de las cepas estudiadas observada previamente por la técnica de ELISA (4). La inmunoreacción en los nódulos fue muy específica, no apreciándose oro coloidal en la membrana peribacteroidal (MPB) ni en otros orgánulos de origen vegetal, como núcleo, pared celular, mitocondrias (M), etc. Los controles con suero preinmune en ningún caso presentaron oro coloidal.

Los lipopolisacáridos de los bacteroides difieren de los que presentan las bacterias en vida libre (6). La utilización de IgG poliespecífica obtenida frente a la superficie de las bacterias en vida libre nos ha permitido la identificación de las bacterias de *Bradyrhizobium*, en los diferentes estados de desarrollo que pueden encontrarse en los nódulos: en gotas de infección, bacterias no diferenciadas, bacteroides en el citoplasma y bacteroides senescentes.

Mediante la técnica empleada ha sido posible la identificación de las cepas de *Bradyrhizobium* ISLU 65 (I) e Hig 5₂ (H) en cultivos mixtos en vida libre (Fig. 3, 5 µg/ml IgG anti-ISLU 65, x 34.000) y en simbiosis (Fig. 4, 5 µg/ml IgG anti-ISLU 65, x 36.000). La inmunoreacción puso de manifiesto la coexistencia de dos cepas de *Bradyrhizobium* en las células de los nódulos de plantas de *L. albus* inoculadas con ambas, observándose el predominio de una de ellas (Fig. 4).

Bibliografía:

1. Vivó A. et al.. 1989. Plant Physiol. 90: 452-457.
2. Bendayan M. y M. Zollinger. 1983. J. Histochem. Cytochem. 31: 101-109.
3. Reynolds E.S. 1963. J. Cell Biol. 17: 208-213.
4. Lucas M.M. 1990. Influencia de la fertilización fosfatada sobre la simbiosis *Lupinus albus* *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*). Producción y Competitividad. Tesis Doctoral. Universidad Complutense. Madrid.
5. Brewin N.J. et al.. 1985. EMBO J. 4: 605-611.
6. Maagad de R.A. et al.. 1989. J. Bacteriol. 171: 1136-1142.



LOCALIZACION ULTRAESTRUCTURAL DE RESIDUOS GlcNAc, GalNAc, Man y Glc EN LAS CELULAS PRINCIPALES Y PARIETALES DE LA MUCOSA FUNDICA HUMANA

J.F. Madrid, M.T. Castells, M. Avilés, F. Hernández y J. Ballesta

Sección de Histología y Embriología General. Facultad de Medicina.
Murcia

Introducción:

El origen de las células parietales y, sobre todo, de las células principales de la mucosa fúndica humana no está perfectamente aclarado. Las lectinas son una buena herramienta citoquímica que nos permite estudiar la evolución de las glucoproteínas celulares estableciendo relaciones con la biogénesis celular, además de conocer el tipo de glucoproteínas producidas por cada tipo celular concreto y su composición sacárica.

Material y Métodos:

Un total de 10 muestras histológicamente normales de mucosa fúndica humana se fijaron en 10% de formol tamponado o en 1% de glutaraldehído en PBS. Las primeras se incluyeron en parafina y las secciones fueron teñidas con las lectinas HPA, ConA y WGA marcadas con peroxidasa (Madrid et al., 1989). Las muestras fijadas en glutaraldehído se incluyeron en Lowicryl K4M y los cortes ultrafinos obtenidos se trataron con HPA-oro coloidal, ConA-peroxidasa-oro coloidal y WGA-ovomucoide-oro coloidal (Madrid et al., 1990). Algunas secciones fueron teñidas con WGA previo tratamiento con neuraminidasa (Castells et al., 1990).

Resultados y Discusión:

Las células principales fueron negativas a HPA; WGA se unía solamente a la membrana apical (Fig. 1), mientras que ConA lo hacía al RER, aparato de Golgi y gránulos de zimógeno. En la región intermedia de las glándulas fúndicas se observan células con gránulos secretores bifásicos que presenta regiones electrodensas y regiones electrolúcidas que varían en proporción. Estos gránulos presentan afinidad en su región electrodensa sólo a ConA (al igual que los gránulos de zimógeno) y en la región electrolúcida a WGA y HPA (Fig. 2) (al igual que las células mucosas del cuello). La membrana celular de los típicos canalículos de las células parietales reaccionó

intensamente con WGA y HPA, y débilmente con ConA. En la región superior de las glándulas se observan células parietales que contienen gránulos electrolúcidos positivos a WGA, HPA y ConA, mientras que el sistema tubulovesicular, que antes era negativo, ahora se tiñe con HPA y en menor medida con WGA.

Los resultados obtenidos en las células principales sugieren que éstas contienen N-glucoproteínas en los gránulos de zimógeno. El otro tipo celular encontrado a mitad de las glándulas, que presenta características intermedias entre células mucosas del cuello y células principales, debe tratarse de células transicionales entre ambas. Células similares han sido descritas previamente, localizando la existencia de pepsinógeno I (Cornaggia et al., 1986). Las células principales procederían de las células mucosas del cuello pasando por este estado intermedio. En la región superior de las glándulas hay células parietales con gránulos electrolúcidos positivos, se puede tratar de células parietales inmaduras que se hayan diferenciado a partir de una célula mucosecretora y debido a ello todavía contengan gránulos mucosos.

Bibliografía:

- Castells MT, Ballesta J., Pastor LM, Madrid JF, Marín JA (1990). Histochemical characterization of glycoconjugates in the epithelium of extrapulmonary airways of several vertebrates. *Histochem J* 22, 24-35.
- Cornaggia M, Capella C, Riva C, Finzi G, Solcia E (1986). Electron immunocytochemical localization of pepsinogen I (Pg I) in chief cells, mucous-neck cells and transitional mucous-neck/chief cells of the human fundic mucosa. *Histochemistry* 85, 5-11.
- Madrid JF, Ballesta J, Castells MT, Marín JA, Pastor LM (1989). Characterization of glycoconjugates in the intestinal mucosa of vertebrates by means of lectin histochemistry. *Acta Histochem Cytochem* 22, 1-14.
- Madrid JF, Ballesta J, Castells MT, Hernández F (1990). Glycoconjugate distribution in the human fundic mucosa revealed by lectin and glycoprotein-gold cytochemistry. *Histochemistry* (in press).

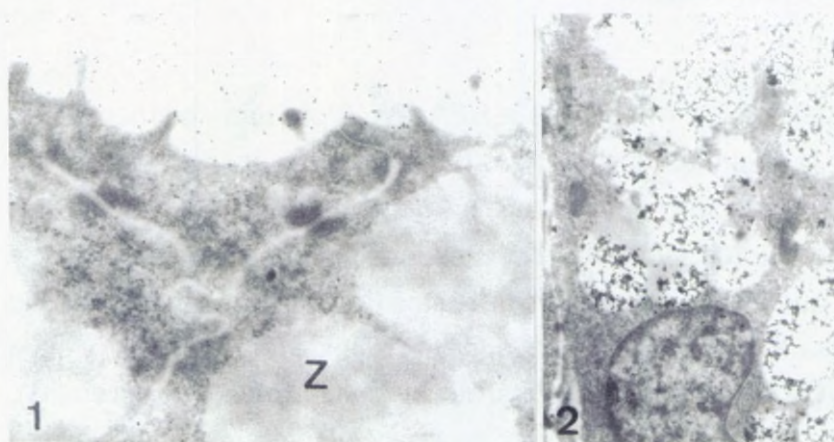


Fig. 1. Célula principal. WGA - Ovomucoide-coloidal. Sólo la membrana apical queda marcada. Los gránulos de zimógeno son negativos. x31.200.

Fig. 2. Célula intermedia entre célula mucosa del cuello y célula principal. HPA-oro coloidal. Los gránulos tienen una apariencia bifásica: la región electrolúcida aparece fuertemente marcada. x11.600.

ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE LAS SECRECIONES GLUCOPROTEICAS DE LAS CELULAS SUPERFICIALES Y MUCOSAS DEL CUELLO DEL ESTOMAGO HUMANO

J.F. Madrid, M.T. Castells, J.V. Ortega, F. Hernández y J. Ballesta

Sección de Histología y Embriología General. Facultad de Medicina.
Murcia

Introducción:

La secreción mucosa de la región fúndica del estómago humano se debe a las células superficiales del epitelio y foveolas y a las células mucosas del cuello. Las propiedades de estas secreciones están íntimamente relacionadas con su composición (Smith & Butler, 1974). La composición glucídica de las secreciones de estas células y su patrón de glucosilación han sido analizados con el empleo de lectinas.

Material y Métodos:

Muestras histológicamente normales de mucosa fúndica tomadas de gastrectomía parciales y afectadas por úlceras duodenales fueron fijadas en 10% de formol tamponado para microscopía óptica y en 1% de glutaraldehído en PBS para microscopía electrónica. Para microscopía óptica las muestras se incluyeron en parafina y las secciones se tiñeron con las siguientes lectinas marcadas con peroxidasa: ConA, HPA y WGA (Madrid et al., 1989). Para microscopía electrónica las muestras se incluyeron en Epon 812 y las secciones ultrafinas fueron incubadas con los siguientes conjugados: HPA-oro coloidal, ConA-peroxidasa-oro coloidal y WGA-ovomucoide-oro coloidal (Madrid et al., 1990). Algunas secciones se trataron previamente con neuraminidasa antes de ser teñidas con WGA (Castells et al., 1990).

Resultados y Discusión:

WGA y HPA fueron positivas en la membrana apical y gránulos secretorios de ambos tipos celulares (Fig. 1). Estos gránulos secretorios presentan una región electrolúcida, marcada por estas lectinas, pero también un centro denso negativo (Fig. 2). ConA se une a estos gránulos solo en las células mucosas del cuello, pero tanto en las zonas electrodensas como en las electrolúcidas. El aparato de Golgi de ambos tipos celulares presenta afinidad por las tres lectinas pero con distinto patrón: en las células superficiales WGA se une uniformemente, HPA principalmente en las zonas cis y trans y el marcaje con ConA es muy débil; en las células mucosas del cuello, WGA se une

a la zona trans, HPA principalmente a la trans y en menor medida a la cis (Fig. 2), y ConA escasamente a través de todo el aparato de Golgi. El RER de las células mucosas del cuello presenta afinidad por ConA y HPA. El pretratamiento con neuraminidasa disminuye la afinidad por WGA.

Los datos obtenidos sugieren que las células superficiales producen O-glucoproteínas en cuya región central junto a GalNAc se encuentra GlcNAc. Estas O-glucoproteínas se situarían en las regiones electrolúcidas de los gránulos secretores. Las células mucosas del cuello también presentarían O-glucoproteínas en las regiones electrolúcidas, pero además podrían contener N-glucoproteínas en la región electrodensa debido a la afinidad encontrada de ConA por el RER, aparato de Golgi y zonas electrodensas de dichos gránulos secretores.

Bibliografía:

- Castells MT, Ballesta J., Pastor LM, Madrid JF, Marín JA (1990). Histochemical characterization of glycoconjugates in the epithelium of extrapulmonary airways of several vertebrates. *Histochem J* 22, 24-35.
- Madrid JF, Ballesta J, Castells MT, Marín JA, Pastor LM (1989). Characterization of glycoconjugates in the intestinal mucosa of vertebrates by means of lectin histochemistry. *Acta Histochem Cytochem* 22, 1-14.
- Madrid JF, Ballesta J, Castells MT, Hernández F (1990). Glycoconjugate distribution in the human fundic mucosa revealed by lectin and glycoprotein-gold cytochemistry. *Histochemistry* (in press).
- Smith B, Butler M (1974). The autonomic control of colonic mucin secretion in the mouse. *Br J Exp Pathol* 55, 605-621.

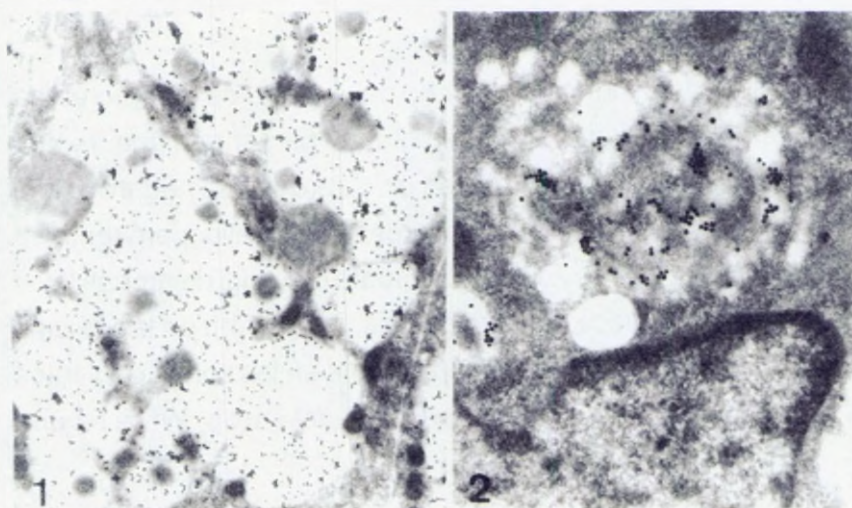


Fig. 1. Célula mucosa del cuello. HPA-oro. La lectina solo une a las zonas electrolúcidas de los gránulos secretores. x14.300.

Fig. 2. Célula mucosa del cuello. HPA-oro. Las partículas de oro se depositan principalmente sobre las zonas electrodensas del trans-Golgi. x34.100.

ADQUISICION DIRECTA DE IMAGENES Y TRATAMIENTO DIGITAL EN MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION.

Sergio Marco, Jose María Carazo, Gerardo Abella, José L. Carrascosa.

Servicio de Microscopía Electrónica.

Centro de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid.
Cantoblanco, 28049, Madrid.

Introducción:

El uso de soportes fotográficos como base material de almacenamiento de imágenes de microscopía electrónica, es el más utilizado en los laboratorios. Se han desarrollado en los últimos años técnicas que presentan ciertas ventajas sobre la fotografía entre ellas el uso de cámaras de video. Presentamos aquí un sistema de adquisición de imágenes, puesto a punto en nuestro laboratorio, fundamentado en estas últimas tecnologías.

Material y Métodos:

Para la obtención, y grabación de imágenes y para su posterior procesamiento digital, se ha utilizado un microscopio electrónico Jeol 1200 EX, conectado a una cámara Jeol TV10S. La cámara de video consta de un cristal fluorescente que se conecta con el tubo de imagen por medio de fibra óptica. La imagen registrada se visualiza en un monitor de televisión CDCT 6151. Todo el sistema se controla por un "frame grabber", que permite la captura de imágenes de hasta 510x510 píxeles del monitor de televisión y su almacenamiento en un ordenador IBM PC/AT.

Resultados y Discusión:

La obtención de imágenes por medio de su grabación, a través del uso de una cámara de video, nos ha permitido realizar un análisis bidimensional de la chaperonina GroEL. Este análisis no presenta diferencias con el obtenido por medio de los sistemas fotográficos de captura de imágenes. Pero se ha podido realizar con una mayor rapidez. Esta rapidez se debe a la eliminación del paso de digitalización, necesario para el caso de fotografías. A su vez, la alta sensibilidad, de la cámara de video, permite la observación de especímenes con densidades de corrientes de 1pA/cm^2 , con las ventajas que supone la observación de especímenes a bajas dosis de electrones.

Por otro lado, el sistema de "frame grabber" utilizado, nos ha permitido realizar promediados de las imágenes observadas, previos a su grabación. El promediado de los campos elimina gran parte del ruido que se aprecia al realizar una grabación de una imagen no promediada.

El sistema resulta por todo lo anterior de gran utilidad para la captura de imágenes por ordenadores para su posterior procesamiento. Se ha aplicado a especímenes individuales (GroEL y ribosomas), si bien también resulta apto para el procesamiento de imágenes cristalinas.

Bibliografía:

APLICACION DE LA MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO (SEM) AL ESTUDIO DEL CICLO CELULAR DE CILIADOS: ENQUISTAMIENTO Y DIVISION EN COLPODA INFLATA.

ana Martín-Gonzalez, Laura Benitez, Gemma Palacios y Juan C. Gutiérrez.

Departamento de Microbiología-I. Facultad de Biología. Universidad Complutense (UCM). 28040 Madrid.

Introducción: La aplicación de técnicas ultramicroscópicas (TEM/SEM) han contribuido notablemente, en los últimos veinte años, al estudio de diferentes procesos de diferenciación en ciliados. La microscopía electrónica de barrido sólo ha sido aplicada, y escasamente, al estudio de quistes de resistencia de algunos ciliados (Gutiérrez et al, 1983; Ricci et al, 1985; Rios et al, 1985, entre otros).

Las distintas especies del género Colpoda presentan en su ciclo biológico dos tipos de quistes; los quistes de división y los quistes de resistencia. Hasta el presente, esta es la primera vez que se aplica la técnica de SEM al estudio de la división y enquistamiento de una especie del género Colpoda.

Material y Métodos: Colpoda inflata (estirpe HSL-1) fue amablemente suministrada por la Dra. E. Simon (University of Illinois, Urbana-Champaign, USA). El cultivo de este ciliado (clones CI08, CI12 y CI24) se realizó monoaxénicamente a 28°C en medio CO₂5E1. El enquistamiento fue inducido en medio de enquistamiento (tampón 0,01M Tris/HCl, pH 6,8).

Para SEM, las muestras fueron fijadas con glutaraldehído 2%(v/v) en PBS, durante 1h. Tras realizar el punto crítico, fueron cubiertas con oro y observadas en un Hitachi S-2300 a 15 Kv.

Resultados y Discusión: El ciclo biológico del ciliado C. inflata se compone de dos partes; el ciclo Crecimiento-División (ciclo C-D) y el ciclo facultativo Enquistamiento-Exquistamiento (ciclo E-E).

Ciclo Crecimiento-División: Cuando la célula vegetativa reniforme (Fig.1) entra en división, incrementa su volumen y se hace esférica. Posteriormente, se rodea de una fina membrana que constituye la pared del quiste de división. Entonces se reabsorbe la ciliación oral, conservándose la somática. Durante la morfogénesis de división, por una parte, la ciliación somática prolifera longitudinalmente y por otra, se produce la proliferación anterior de algunas cinetias somáticas ventrales en ambas células hijas (tomitos) para constituir las ciliaciones orales respectivas. Finalmente, la membrana del quiste de división se rompe, liberándose las dos o cuatro células hijas (Fig. 2). En este último caso, los dos tomitos-I (procedentes de la primera división) se separan antes del comienzo del proceso estomatogénico,

colocandose en posición adyacente dentro del quiste. A continuación, en cada tomito-I se producen los mismos fenómenos corticales que tienen lugar durante la división de una sola célula.

El ciclo C-D tiene una duración media aproximada de 7 horas a 28°C.

* Enquistamiento: En condiciones de inanición, la célula vegetativa no puede dividirse ante la falta de aporte nutricional y el sistema vivo entra en el ciclo E-E (Gutiérrez et al, 1990).

Después de la inducción de enquistamiento, la célula adquiere forma esférica. A las 8h tras la inducción, la célula prequística muestra una superficie rugosa debido a la pérdida de agua intracelular. Posteriormente, la superficie prequística se vuelve lisa debido a la secreción uniforme de precursores de pared quística.

La pérdida de volumen sufrida por la célula se estima en un 65% aproximadamente. El quiste maduro carece de ornamentaciones, poros u ostiolas. (Fig.3) El proceso de enquistamiento tiene una duración, a 28°C, de 180-200 horas.

Este trabajo está financiado por la DGICYT, proyecto PB87-0006.

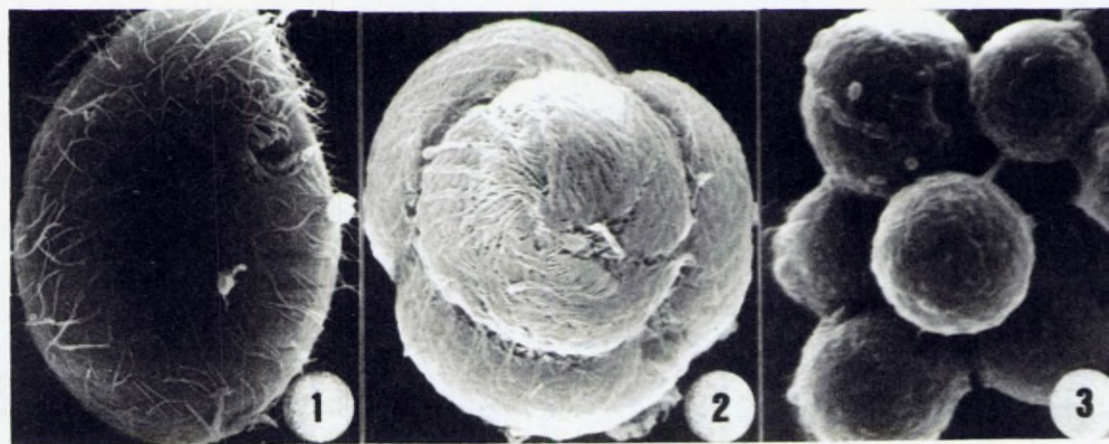
Bibliografía

Gutiérrez, J.C., Torres, A & Perez-Silva, J. (1983). Trans. Am. Microsc. Soc. 102, 55-59.

Gutiérrez, J.C., Martín-Gonzalez, A & Matsusaka, T. (1990). BioSystems. 24, 17-24.

Ricci, N., Verni, F. & Rosati, G. (1985). Trans. Am. Microsc. Soc. 104, 70-78.

Rios, R.M., Torres, A., Calvo, P. & Fedriani, C. (1985). Protistologica. 20, 481-485.



x 1.575

x 2.100

x 2.100

ANÁLISIS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DE FORMAS CRIPTOBIO- TICAS TERATOLOGICAS EN EL CILIADO COLPODA INFLATA : UN ESTUDIO COMPARATIVO

Ana Martín-Gonzalez, Gemma Palacios, Laura Benitez y Juan C. Gutiérrez.

Departamento de Microbiología-I. Facultad de Biología. Universidad
Complutense (UCM). 28040 Madrid.

Introducción: En el estudio de procesos de diferenciación celular, es importante la obtención y el análisis de formas anormales que surjan, tanto durante dicho proceso como forma definitiva diferenciada. Estas anomalías sirven para un mejor conocimiento de los mecanismos involucrados en el proceso de diferenciación. En ciliados, el proceso de enquistamiento o criptobiosis es un complejo proceso de diferenciación celular eucariota. Hasta la fecha, pocos trabajos se han realizado sobre alteraciones o anomalías, ya inducidas o espontaneas, que surjan durante la formación del quiste de resistencia (Gutiérrez & Perez-Silva, 1983; Benitez et al. 1989). En el presente trabajo se estudian por TEM quistes teratológicos de Colpoda inflata.

Material y Métodos: Colpoda inflata (estirpe HSL-1) fue amablemente suministrada por la Dra. E. Simon (University of Illinois, Urbana-Champaign, USA). El cultivo de este ciliado se realizó monoaxénicamente a 28°C en medio CO₂5E1. El enquistamiento fue inducido en medio de enquistamiento (tampón Tris 0,01M/HCl pH 6,8). Las muestras fueron fijadas (30 min) en glutaraldehído al 2% en PBS, lavadas (30 min) 3 veces y postfijadas durante 1h en OsO₄ tamponado (1%). Luego las muestras fueron deshidratadas en una serie creciente de etanol y embebidas en resina Spurr. Las secciones ultrafinas se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo, examinándose en un microscopio electrónico de transmisión Phillips EM-300 a 80 Kv.

Resultados y Discusión:

* Características de los quistes de resistencia normales: (Fig. 1). Los quistes de resistencia de C. inflata son esféricos, con un diámetro medio de 19,48 µm. La pared quística está constituida por dos capas morfológicamente diferentes; ectoquiste y endoquiste, presentando un grosor medio de 2,37 µm. La capa más externa (ectoquiste) de aspecto fibrilar, está formada por material amorfo muy compacto. La capa más interna o endoquiste es la más gruesa y se compone de material fibroso sin una orientación determinada. En esta capa se pueden distinguir dos zonas; una más externa y compacta, y otra más interna y gruesa. El citoplasma quístico está muy condensado debido a la pérdida de agua intracelular sufrida durante el enquistamiento, conteniendo numerosos autofagosomas densos a los electrones, que contienen material celular no identificable. Las mitocondrias son tubulares y se disponen formando pequeñas agrupaciones. El citoplasma quístico es

muy rico en retículo endoplasmático rugoso y ribosomas libres sin formar estructuras paracristalinas. También contienen numerosos granulos elipsoi-
dales u ovoides que probablemente son inclusiones de paraglucogeno.

* Características de los quistes de resistencia teratológicos: (Fig. 2).
Los quistes anormales o teratológicos de C. inflata presentan las siguientes características diferenciativas con respecto a los normales:

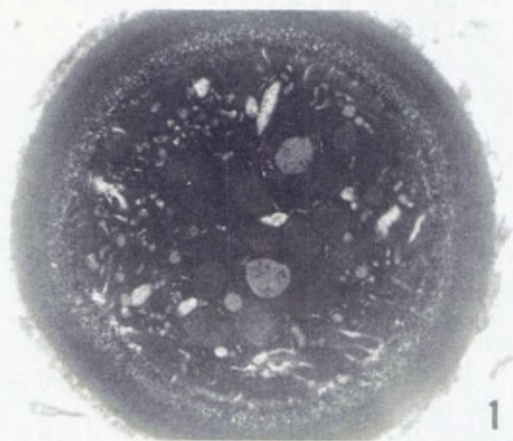
1- Su forma no es esférica, sino ligeramente ovoide. Presentan un menor tamaño (diámetro medio de 8,98 μm). 2- La estructura de la pared quística es incompleta. Sólo está constituida por un ectoquiste amorfo y de grosor irregular. 3- El citoplasma quístico presenta abundantes ribosomas, y a menudo se disponen en configuraciones paracristalinas. 4- Sólo se observan algunas mitocondrias dispersas en el citoplasma. Estas mitocondrias son más electrodensas y poseen muy pocas crestas. Como conclusión general, podemos decir que estos quistes teratológicos no son viables al menos por dos razones; presentan una pared quística defectiva y las mitocondrias presentan grandes alteraciones funcionales.

Estos quistes, que aparecen en clones antiguos de C. inflata, podrían ser el resultado de varias alteraciones en el mecanismo, altamente regulado, de enquistamiento.

Este trabajo está financiado por la DGICYT, proyecto PB87-0006.

Bibliografía

- Benitez, L., Martín-Gonzalez, A. & Gutiérrez, J.C. (1989). XII Congreso Nacional de Microbiología (SEM). Pamplona.
- Gutiérrez, J.C. & Perez-Silva, J. (1983). Journal of Protozool. 30: 715-718.



x 11.700



x 18.900

SECUENCIA DEL AGRUPAMIENTO DE LAS PROTEINAS CONTRACTILES PARA FORMAR EL ESBOZO DE LA SARCOMERA EN LOS MIOBLASTOS DEL MIOTOMO.

Martínez Alonso, F.J., Toledo Lobo, M.V.,
Martínez Cuadrado, G. y González Santander, R.

"Ciencias Morfológicas y Cirugía". Cátedra de Histología.
Facultad de Medicina. Universidad de Alcalá de Henares.

Introducción: La miofibrillogénesis es un proceso que se precipita con gran rapidez desde el momento de su iniciación. Desde la aparición de los primeros miofilamentos finos hacia el estadio 17 de HAMBURGER y HAMILTON hasta la formación del primer esbozo de sarcomera en el estadio 19 transcurren solamente unas 25 horas. Como consecuencia de esta y otras dificultades intrínsecas al estudio de la secuencia de acontecimientos que conduce a la formación de la sarcomera, los resultados que aportan los distintos autores son frecuentemente contradictorios (ALLEN y PEPE, 1965; PRZYBYLSKI et al, 1966; TOMANEK, 1977; NATHANSON, 1989). Con objeto de aclarar estas y otras cuestiones, hemos estudiado el proceso de agrupación y ordenamiento de los miofilamentos finos y gruesos, y se propone como hipótesis una secuencia de acontecimientos en el proceso de formación de la sarcomera.

Material y Métodos:

Varias series de embriones de pollo de los estadios 17 al 20 de HAMBURGER y HAMILTON se extrajeron en líquido Ringer y se fijaron en glutaraldehído al 3% durante tres horas. Se diseccionaron piezas que comprendían: el tubo neural, la notocorda y los somitos braquiales. Estas piezas fueron postfijadas en ácido ósmico al 1% durante hora y media. Teñidas con acetato de uranilo al 2%, se incluyeron en araldita (GONZÁLEZ SANTANDER, 1969). Se hicieron cortes semifinos que se tiñeron con azul de toluidina y cortes ultrafinos que fueron teñidos con citrato de plomo y observados al microscopio electrónico de transmisión.

Resultados y Discusión: Según nuestras observaciones, en la rápida sucesión de acontecimientos que conducen a la formación de la sarcomera, se diferencian las etapas que a continuación describimos:

1) La miofibrillogénesis se inicia en los mioblastos de los estadios 16-17. Los primeros cambios que se producen en zonas puntuales del citoplasma consisten en una disminución de la concentración de ribosomas y un incremento de la claridad citoplasmática en relación al resto de la célula. En estas zonas se observan los primeros miofilamentos, de 5 a 7 nm de diámetro y longitud variable, identificados como filamentos finos, que en estas áreas claras se disponen al azar. 2) Los primeros filamentos gruesos se observan en el estadio 18, cuando ya existe una notable cantidad de filamentos finos. Estos primeros filamentos gruesos aparecen en áreas densas del citoplasma y se ordenan en paralelo, integrando pequeños acúmulos en la periferia celular, próximos al sarcolema. 3) En algunas de nuestras imágenes, hemos observado una cierta orientación de los filamentos finos en el sarcoplasma, adoptando en conjunto el

aspecto de una corriente de filamentos desplazándose hacia las zonas donde se acumulan los filamentos gruesos. 4) Según nuestras observaciones, ambos tipos de filamentos se asocian, al introducirse los filamentos finos en el espacio existente entre dos filamentos gruesos. Cuando se interdigita un mayor número de filamentos finos entre los gruesos, la imagen obtenida sugiere una primitiva banda A. Estos acúmulos de filamentos finos y gruesos se observan en algunas ocasiones próximos entre si y alineados en el mismo eje longitudinal, lo cual permite suponer que formarán parte de la misma miofibrilla. El crecimiento longitudinal de la sarcomera se produce a partir de la formación de nuevos acúmulos de filamentos gruesos, entre los cuales se interdigitan los finos, de manera que la sarcomera crece a partir de la formación de nuevos esbozos de banda A. 5) Si bien encontramos acúmulos de filamentos finos y gruesos alineados en el mismo eje longitudinal y separados por una pequeña zona libre de material filamentososo, en otras imágenes observamos este espacio ocupado por filamentos finos, lo cual se aprecia como zonas más claras entre dos primitivos esbozos de banda A. Estas áreas claras serian el primer esbozo donde se situara la banda I. 6) En estas áreas claras encontramos zonas densas que se identifican como el primordio de la banda Z. También se aprecian, en otras imágenes, parte de las membranas del reticulo sarcoplasmico abrazando el esbozo de la sarcomera.

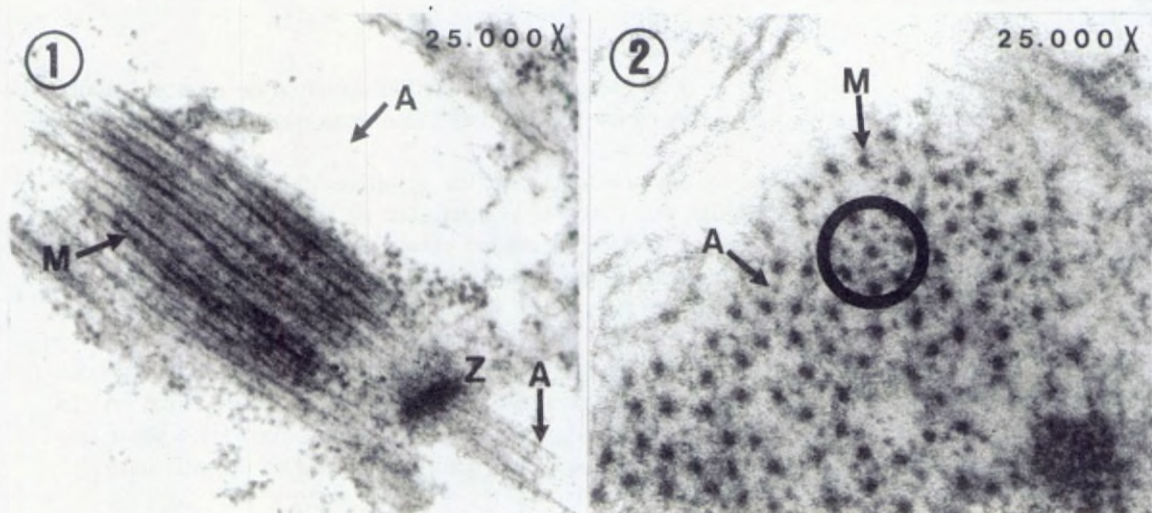
En secciones longitudinales, hemos podido comprobar el inicio de la formación de las bandas A, Z e I (Fig. 1). En secciones transversales, comprobamos la ordenación de los filamentos en estructuras hexagonales, de forma que cada filamento grueso se rodea de seis filamentos finos (Fig. 2).

Bibliografía:

- PRZYBYLSKI, R.J. et al; Lab. Invest. 15:836-862 (1966).
 GONZALEZ SANTANDER, R.; (ed.) Aguilar. Madrid. (1969).
 TOMANEK, R.J. et al; Am. J. Anat. 149:227-246 (1987).
 NATHANSON, M.A. Intern. Rev. Citol. 116:89-164 (1989).

Fig. 1 Mioblasto. Sección longitudinal. Esbozo de sarcomera.

Fig. 2 Mioblasto. Sección transversal. Disposición hexagonal de los filamentos
 A Miofilamento fino. M Miofilamento grueso. Z Banda Z.



CENTRIOLOS, CUERPOS BASALES Y RAICILLAS CILIARES

EN EL NÚCLEO PERIACUEDUCTAL DEL MESENCÉFALO

Martínez Cuadrado, G., González Santander, R., Martínez Alonso, J. y Toledo Lobo, A. J.

Departamento de "Ciencias Morfológicas y Cirugía".

HISTOLOGÍA. Facultad de Medicina.

Universidad de Alcalá de Henares. Madrid.

Introducción:

La presencia de "neuronas ciliadas" ha sido puesta de manifiesto por distintos autores, incluyendo los "cuerpos basales" y las "raicillas ciliares" (DAHL, 1963; MILHAUD y PAPAS, 1963; RUELA et al., 1961; MARTÍNEZ CUADRADO y GONZÁLEZ SANTANDER, 1969). El origen y significado funcional de los cilios en neuronas ha sido muy discutido, interpretándolos como estructuras vestigiales (PEREZ DEL CERRO y SNIDER, 1967). La aparición, además, de centriolos en las neuronas, nos hace buscar una explicación a la presencia de los mismos, acompañada de "raicillas ciliares" en las neuronas del mesencéfalo, porque sus ciclos mitóticos, en los que participa el centriolo, han sido agotados.

Material y Métodos:

Gatos domésticos fijados mediante perfusión vascular con glutaraldehído al 2,5 % en tampón de cacodilato sódico, lavados antes y después con solución de Ringer. El encéfalo se extrajo de la cavidad craneana cuando el animal se encontraba fijado y rígido. Posteriormente se disecó el mesencéfalo sumergido en tampón-sucrosa. Se post fijó en ácido ósmico al 3 % durante tres horas. Se incluyó en araldita, previo lavado en acetato de uranilo al 2 %. Los cortes ultrafinos se tiñeron con citrato de plomo, y se observaron al microscopio electrónico de transmisión, tomando fotografías de neuronas con "centriolos", presentes en el núcleo periacueductal mesencefálico.

Resultados y Discusión:

El núcleo dorso-lateral de la sustancia gris periacueductal del mesencéfalo, ha sido observado en sus componentes: neuronas, neuroglia, y haces de gliofibrillas.

Las "neuronas" tienen forma redondeada, no estrelada, estando rodeadas por múltiples contactos sinápticos unas, y sin ninguno de ellos otras.

Las "neuroglia" son astrocitos protoplásmicos, y muy pocos oligodendrocitos. Hay gruesos haces de "gliofilamentos" que contactan íntimamente con la membrana plasmática de las neuronas.

El centro del núcleo neuronal está surcado en todas direcciones por fibras nerviosas amielínicas y pequeñas fibras nerviosas mielínicas.

En algunas neuronas hemos observado "dobles centriolos", situados siempre en el soma periférico de la célula, por decajo de la membrana plasmática, formando ángulo recto entre sí, de tal forma que uno se corta transversalmente,

y otro longitudinalmente (Figura). En otras neuronas hemos visto "cuerpos basales" situados muy cerca de la membrana plasmática.

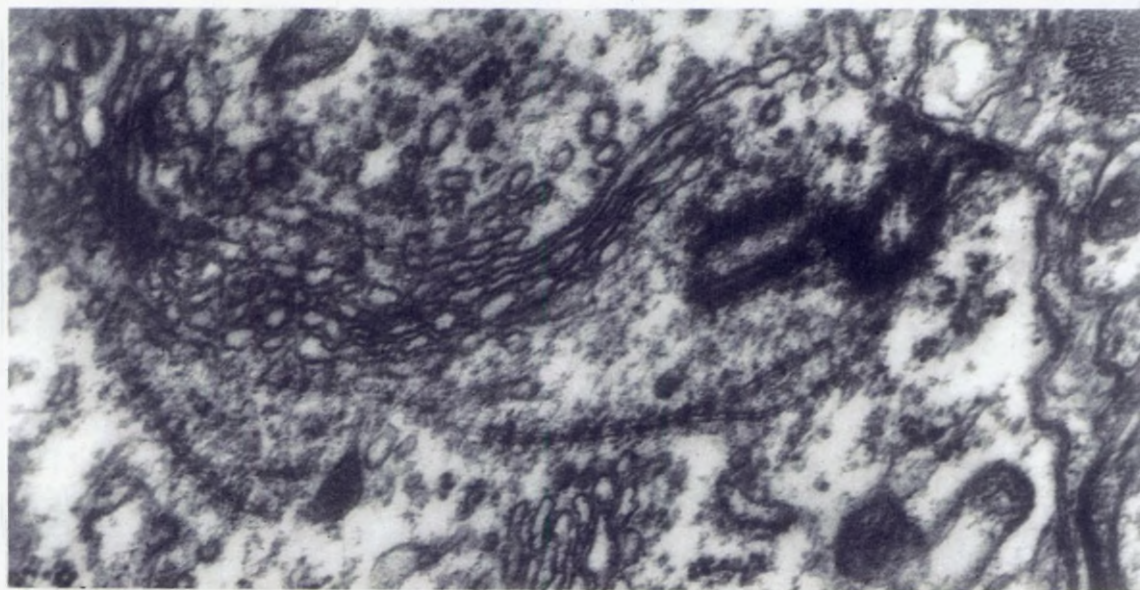
Tanto los "dobles centriolos" como los "cuerpos basales" se encuentran al lado de "dictiosomas" del complejo de Golgi, en neuronas carentes de sinapsis.

En el caso de los dobles centriolos, el complejo de Golgi es muy extenso, y entre sus dictiosomas se sitúan varias "raicillas ciliares" de anclaje, con su típica estriación transversal periódica, que llegan a tomar contacto con los microtúbulos de las unidades de los centriolos (Figura). En su cercanía se observan mitocondrias.

Se discute la posibilidad de que la diferenciación ultraestructural de las "raicillas ciliares" con estriación periódica, estén en íntima relación y dependencia de las "vesículas de los dictiosomas" del complejo de Golgi, que aparecen ordenadas linealmente, y que se generan en la zona cercana a los centriolos y a los cuerpos basales, con la participación de la energía que facilitan las mitocondrias situadas en su inmediata vecindad.

Bibliografía:

- DAHL, H.A.: Z. Zellforsch. 60:369-386(1963).
- MILHAUD, M. and PAPAS, G.D.: J. Cell. Biol. 37:599-609(1968).
- PEREZ del CERRO, M.P. and SNIDER, R.S.: J. Microsc. 6:515-518(1967)
- MARTINEZ CUADRADO, G. y GONZALEZ SANTANDER, R.: Histol. Med. 5:9-10(1981)
- RUELA, C. et al.: Experientia. 37:197-202(1981).



METODO DE DESULFATACION PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA

J.A. Martínez-Menárguez, M. Avilés, M.T. Castells,

M. García* y J. Ballesta

Sección de Histología y Embriología General.

Facultad de Medicina.Murcia.

*Servicio de Microscopía Electrónica. Universidad de Murcia.

Introducción:

Los radicales sulfato y el ácido siálico son dos grupos corrientes en las mucinas digestivas que aportan a éstas carga negativa. Debido a esta propiedad se han utilizado para su detección colorantes básicos como el Azul Alcian (Thomopoulos et al., 1983). Sin embargo, con estas técnicas no se pueden diferenciar ambos grupos ácidos. La técnica de desulfatación seguida de técnicas histoquímicas convencionales es un método corriente en microscopía de luz para la diferenciación de sulfo y sialomucinas (Ganter and Jolles, 1969). A pesar de su alta utilidad no ha sido puesta a punto para microscopía electrónica. En el presente trabajo, nos propusimos desarrollar esta técnica a nivel ultraestructural.

Material y Métodos:

Muestras de intestino delgado y grueso de rata Wistar fueron fijadas en glutaraldehído al 1% en PBS. Previo a la inclusión, las muestras fueron desulfatadas por metilación durante 19 h en HCl al 1% en alcohol metílico a 60° C, seguida de una saponificación en hidróxido bórico al 1,8% en solución acuosa durante 6 h a 0° C. Para la comprobación de los resultados, tras la desulfatación se realizó una técnica de HID "preembedding" para demostrar que no había grupos sulfato, y la técnica de HCl-PTA "postembedding" a las secciones de muestras desulfatadas para comprobar que el moco no había sido extraído de las muestras. Como controles se utilizaron muestras similares de tejidos que fueron teñidas con las técnicas de HID y HCl-PTA pero sin previo tratamiento de desulfatación.

Resultados y Discusión:

En secciones semifinas de muestras a las que previamente se les ha realizado la técnica de HID "preembedding" puede observarse que las células caliciformes tanto de intestino delgado como grueso aparecen teñidas. En secciones ultrafinas se observa que, además de en los gránulos mucosos, aparece reactividad en las microvellosidades, en las cisternas trans de los aparatos de Golgi y en el "Trans Golgi Network" (TGN). En las células caliciformes puede observarse una desigual

reactividad en los gránulos mucosos (Fig. 1). Las muestras desulfatadas y teñidas con HID no presentan reactividad a esta tinción (Fig. 2). Tras la desulfatación la morfología observada es buena. Con HCl-PTA se demuestra que el moco no se ha eliminado con el tratamiento.

De los resultados obtenidos se concluye que esta técnica también puede emplearse en histoquímica de carbohidratos para la eliminación selectiva de los grupos sulfato a nivel de microscopía electrónica. Esta técnica, unida a técnicas histoquímicas de detección de mucosustancias ácidas a nivel ultraestructural, nos permite la diferenciación de sulfo y sialomucinas.

Bibliografía:

- Ganter P., Jolles G. (1969): *Histochimie normale et pathologique*. Ed. Gauthier-Villars. Paris.
- Thomopoulos G.N., Schulte B.A., Spicer S.S. (1983): Light and electron microscopic cytochemistry of glycoconjugates in the rectosigmoid colonic epithelium of the mouse and rat. *Am. J. Anat.* 168, 239.

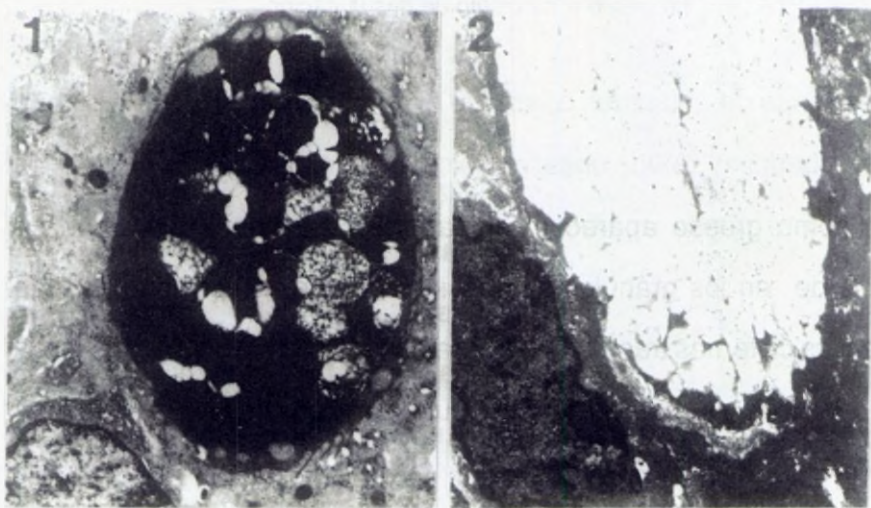


Fig. 1.-Célula caliciforme del intestino grueso. HID "preembedding". Puede observarse que no todos los gránulos mucosos presentan la misma reactividad a la técnica de HID. x20.000.

Fig. 2.-Célula caliciforme de intestino grueso. Técnica de desulfatación seguida de tinción con HID. No se observa reactividad en los gránulos mucosos. x20.000.

INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE RADICALES SULFATO EN LA UNIÓN DE LA LECTINA PEANUT AGGLUTININ (PNA).

J.A. Martínez-Menárguez, M. Avilés, J.F. Madrid y J. Ballesta
Sección de Histología y Embriología General.
Facultad de Medicina.Murcia.

Introducción:

Las lectinas son proteínas o glucoproteínas de origen no immune que presentan gran afinidad y una alta especificidad por determinados azúcares. PNA es una lectina muy empleada en histoquímica de carbohidratos para la detección de lactosa (Lotan et al., 1975). Se ha comprobado que la accesibilidad de esta lectina a un azúcar específico puede ser impedida por la presencia en el glucoconjugado de residuos de ácido siálico terminal. El objeto del presente trabajo es determinar si los grupos sulfato también influyen en dicha unión.

Material y Métodos:

Muestras de intestino delgado y grueso de rata fueron fijados en una mezcla de Hg (1%), acetato sódico (0,1%) y glutaraldehído (1%) o en formol al 10% en PBS. Se obtuvieron secciones de 5 μ m que fueron teñidas con PNA conjugada con peroxidasa. Debido a esto, en algunas secciones se desulfató mediante la técnica de metilación-oxidación. Muestra de estos mismos tejidos se fijaron en glutaraldehído al 1%. Sin desulfatación de una parte de ellas, las muestras se procesaron rutinariamente e incluyeron en Epon 812. En las secciones ultrafinas se realizó una técnica de PNA-peroxidasa.

Resultados y Discusión:

Con microscopía de luz se observa tinción en una estrecha banda en la zona paranuclear de enterocitos y células caliciformes tanto en intestino delgado como grueso (Fig. 1). En las muestras fijadas con la mezcla de cloruro mercuríco, la intensidad de tinción es más alta que en las fijadas con formol, aunque la morfología preservada es peor. Tras desulfatación aparece una intensa tinción en el moco de las células caliciformes y en las microvellosidades de los enterocitos (Fig. 2). Con el

microscopio electrónico se observa que la reactividad supranuclear observada en microscopía óptica se corresponde con el aparato de Golgi. Los gránulos de moco en las células caliciformes son muy reactivos tras la desulfatación.

En el presente trabajo se demuestra que los grupos sulfato afectan a la unión de PNA. Se ha sugerido que las cargas de los residuos glucídicos pueden intervenir en la unión al azúcar específico (Debray et al., 1981). Dado que previamente había comprobado que el ácido siálico también afecta, postulamos que este enmascaramiento puede ser debido a un efecto de carga.

Bibliografía:

- Debray H., Decout D., Strecker G., Spik G., Montreuil J. (1981): Specificity of twelve lectins toward oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins. *Eur. J. Biochem.* 117,41-50.
- Lotan R., Skutelsky E., Danon D., Sharon N. (1975): The purification, composition, and specificity of the anti-t lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). *J. Biol. Chem.* 250,8518.

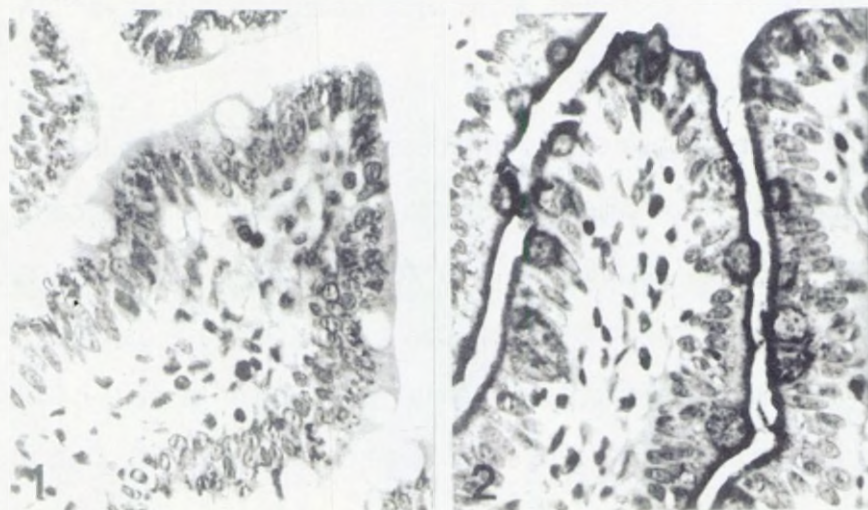


Fig. 1.-Intestino de ratón. PNA-HRP. Las vellosidades y las células caliciformes presentan reactividad a esta técnica. x 625.
Fig. 2.-Intestino de ratón. Desulfatación. PNA-HRP. Tras realizar la técnica de desulfatación, las vellosidades y las células caliciformes muestran reactividad reducida a PNA. x 525.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION ULTRAESTRUCTURAL DE LAS CELULAS SANGUINEAS DE LUBINA (*Dicentrarchus labrax* L.).

MESEGUER J., ESTEBAN MA, MUÑOZ J, AGULLEIRO B.

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

FACULTAD DE BIOLOGIA. UNIVERSIDAD DE MURCIA. MURCIA.

Introducción:

Existe una gran confusión respecto a la clasificación, características tintoriales morfofuncionales de las células sanguíneas de peces. Se ha indicado recientemente que la identificación de dichas células es más fácil y precisa si se realiza mediante criterios ultraestructurales. Sin embargo, la separación de las diferentes poblaciones circulantes sólo es posible en la actualidad aplicando técnicas de aislamiento o/y con marcadores específicos. Nuestro trabajo consiste en el estudio ultraestructural de las células sanguíneas de lubina (*Dicentrarchus labrax* L.) presentes en cada una de las fracciones obtenidas por centrifugación en gradiente de Percoll.

Material y Métodos:

Suspensiones celulares de sangre de lubina (*Dicentrarchus labrax* L.) diluida en medio RPMI-1640 fueron depositadas sobre gradientes continuos (Bayne 1986) o sobre gradientes discontinuos (Braun-Nesje y col. 1981) de Percoll. Tras la centrifugación, las diferentes bandas de densidad fueron procesadas par su estudio microscópico electrónico según la técnica convencional. Las densidades de las fracciones fueron estimadas mediante bolas coloreadas de densidad calibrada. (Pharmacia Ltd).

Resultados y Discusión:

Todas las células sanguíneas de lubina se encuentran dentro de un rango de densidad que oscila entre 1.018 y 1.142 g/ml (Fig. 1). Los trombocitos se sitúan preferentemente en una fracción de 1.077 g/ml. los granulocitos neutrófilos lo hacen en la de 1.081 g/ml y los linfocitos aparecen en una banda de densidad más amplia situada entre 1.098 y 1.133 g/ml. Observamos además una ordenación de los eritrocitos, desde la densidad de 1.018 g/ml hasta la de 1.142 g/ml según su maduración, de manera que los más ligeros son los eritroblastos policromatófilos y los más densos los eritrocitos maduros.

Cuando la suspensión de células sanguíneas de lubina se centrifuga en un gradiente discontinuo (Fig. 2) los eritrocitos se depositan en el fondo del tubo, mientras que los desechos y las células rotas permanecen sobre el gradiente. En la interfase de Percoll se sitúan todos los leucocitos mezclados (Fig. 3), habiendo sido identificados la mayoría de ellos como trombocitos, linfocitos y granulocitos heterófilos (Figs. 4,5,6).

DISCUSION

La mayoría de los estudios relativos a la separación de las células sanguíneas de teleosteos se refieren a linfocitos circulantes (Lewis y col. 1978; Blaxhall 1981) o a los distintos tipos celulares presentes en riñón cefálico (Braun-Nesje y col. 1982; Bayne 1986). Mediante el empleo de gradientes continuos de Percoll hemos obtenido fracciones enriquecidas de granulocitos heterófilos, trombocitos y linfocitos. Los restantes tipos celulares sanguíneos no aparecen formando fracciones definidas, probablemente debido a que son escasos en sangre circulante o a que se pierden durante el proceso de aislamiento.

La caracterización ultraestructural de las células aisladas, se ha llevado a cabo mediante aplicación de los criterios establecidos en anteriores trabajos (Esteban y col. 1989; Meséguer y col. 1990).

FIGURAS 1 y 2: Esquema de localización en bandas de densidad de las células sanguíneas de lubina. Gradientes continuo (1) y discontinuo (2) de Percoll.

FIGURA 3: Células sanguíneas de la interfase de un gradiente discontinuo de Percoll. X1500.

FIGURA 4: Trombocito. X7500.

FIGURA 5: Linfocito. X5000.

FIGURA 6: Granulocito heterófilo. 4500.

Bibliografía

BAYNE CJ (1986) Vet Immunol Immunopathol 12:141-151.

BLAXHALL PC (1981) J Fish Biol 18:177-181.

BRAUN-NESJE R, BERTHEUSSEN K, KAPLAN G, SELJELID R (1981) J Fish Dis 4:141-151.

BRAUN-NESJE R, KAPLAN G, SELJELID R (1982) Dev Comp Immunol 5:597-606.

ESTEBAN MA, MESEGUER J, GARCIA AYALA A, LOPEZ RUIZ A, AGULLEIRO B (1989) Arch Histol Cytol 52:407-419.

LEWIS DH, EURELL TE, CANNON MS, GRUMBLES LC (1978) J Fish Biol 14:31-37.

MESEGUER J, ESTEBAN MA, GARCIA AYALA A, LOPEZ RUIZ A, AGULLEIRO B (1990) Arch Histol Cytol 53:287-296.

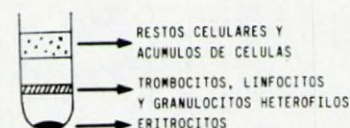


FIGURA 1.

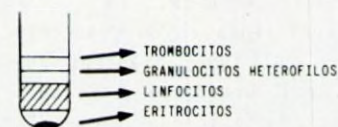
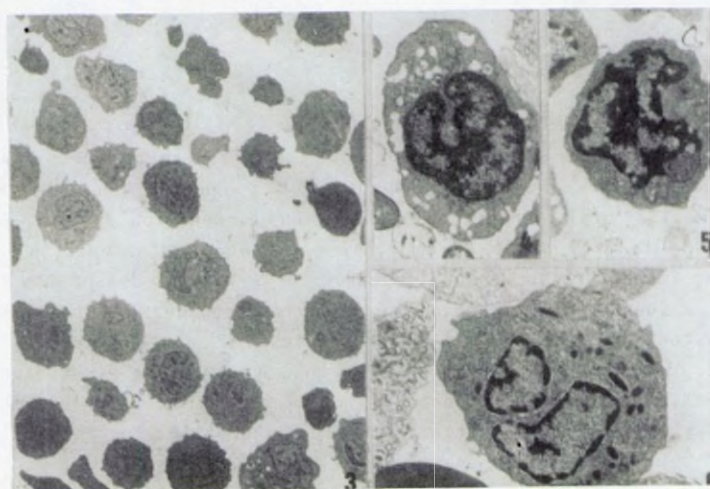


FIGURA 2.

1

2



ULTRAESTRUCTURA DEL TUBULO RENAL DE LA LUBINA (Dicentrarchus labrax L.).

MESEGUER J, GARCIA AYALA A, ESTEBAN MA, AGULLEIRO B.

BIOLOGIA CELULAR

FACULTAD DE BIOLOGIA. UNIVERSIDAD DE MURCIA. MURCIA

El riñón y la branquia de teleósteos son los órganos más importantes implicados en el control homeostático, de modo que las diferencias de habitat imponen importantes modificaciones estructurales que son reflejo de un mecanismo de adaptación funcional (Hwang y Wu, 1988). En teleósteos marinos se producen cantidades mínimas de orina, debido a limitaciones en el mecanismo de concentración urinario, por ello el principal papel del riñón es la excreción de iones divalentes como resultado de la actividad del túbulo renal (Raukin y col., 1983). Aunque se han descrito algunos de los cambios estructurales producidos para producir dicha actividad secretora, varios aspectos ultraestructurales así como su correlación morfofuncional no han sido establecidos y necesitan ser aclarados. Nuestro trabajo tiene como objeto el estudio de la ultraestructura del túbulo renal de lubina (Dicentrarchus labrax L.) teleósteo marino eurihalino, prestando especial atención a diferentes aspectos morfofuncionales.

Material y Métodos:

Fragmentos de riñón caudal de ejemplares adultos de lubina (Dicentrarchus labrax L.), de 150 gr de peso y 20-30 cm de longitud, capturados en primavera en el Mar Menor de Murcia, habitat de elevado índice de salinidad (35-45‰), fueron procesados según la técnica convencional para su estudio microscópico electrónico.

Resultados y Discusión:

El túbulo renal de lubina consta de corpúsculo renal, segmentos proximales I y II y de una nefrona distal patente (segmento distal, segmento colector y túbulo colector). En el corpúsculo renal destaca la presencia de una barrera de filtración estrecha, de un mesangio escasamente desarrollado y de podocitos provistos de grandes vesículas de densidad variable. Dichos aspectos ultraestructurales se consideran característicos de teleósteos marinos estenohalinos (López Morales, 1990). En teleósteos marinos, también se presentan comúnmente tres segmentos proximales (Hentschel y Elger, 1988; López Morales y col., 1990). Sin embargo, en lubina sólo existen dos. Lo más destacable del túbulo renal de la lubina es la existencia de una nefrona distal semejante a la de peces de agua dulce (Hickman y Trump, 1969; Hentschel y Elger, 1988) en la que aparece un segmento distal provisto de un laberinto basal bien desarrollado, habitualmente ausente en especies eurihalinas (Ogawa, 1962; López Morales y col., 1990), así como la de un segmento colector y un túbulo colector cuyas células presentan numerosas vesículas mucosecretoras.

FIGURAS

Figura 1: Corpúsculo renal. X5000.

Figura 2: Segmento proximal I. X3750.

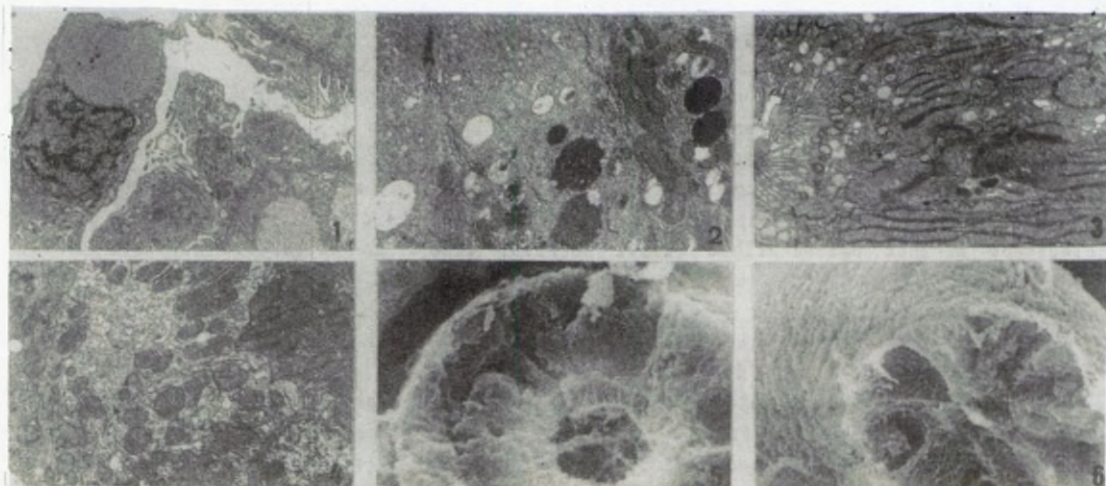
Figura 3: Segmento distal. X 3750.

Figura 4: Segmento colector. X 3750.

Figuras 5 y 6: Micrografías electrónicas de barrido. 5. Segmento proximal. X 1000. 6. Segmento distal. X 2000.

Bibliografía

- HENTISCHEL H y ELGER M** (1988). Comparative Aspect of the Distal Nephron. En: The Distal Nephron in the Kidney of Fishes. Advan. Anat. Embryol. Cell Biol. 108. Springer-Verlag. p. 11-118.
- HICKMANN CP y TRUMP BF** (1969). The Kidney. En: Fish Physiology. Academic Press New York y London. p. 91-239.
- HWANG PP y WU SM** (1988). J. Fish Biol. 33:89-96.
- LOPEZ MORALES E, MESEGUER J, LOZANO MT, AGULLEIRO B** (1990). Anat. Anz. Jena, 170:49-61.
- OGAWA M** (1962). Sci. Red. Saitama Univ. 4:107-129.
- RAUKIN JC, HENDERSON IW, BROWN JA** (1983). Osmoregulation and the control of kidney function. En: Control Process in Fish Physiology. Croom Helm London y Camberra. p. 66-88.



CARACTERIZACION ULTRAESTRUCTURAL DE LAS CELULAS SANGUINEAS DE DORADA (*Sparus aurata* L.).

MESEGUER J. LOPEZ RUIZ A, GARCIA AYALA A, AGULLEIRO B.

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR.

FACULTAD DE BIOLOGIA. UNIVERSIDAD DE MURCIA. MURCIA.

roducción:

La existencia de un patrón hematológico común para todos los vertebrados es ampliamente aceptada. Aunque se han realizado diferentes estudios en peces, no existen criterios de uniformidad para las células sanguíneas de este grupo (ROWLEY y col., 1988). Las diferencias establecidas, fundamentalmente en el patrón leucocitario, son probablemente debidas a la metodología empleada (KUSUDA e IKEDA, 1987). Nuestro estudio pretende la identificación y descripción de los tipos celulares presentes en sangre circulante de dorada (*Sparus aurata* L.) mediante microscopía electrónica de transmisión y de barrido.

Material y Métodos:

Muestras de sangre obtenidas por punción de la vena caudal fueron centrifugadas a 400g durante 15 minutos. Las cubiertas leucocitarias fueron fijadas en glutaraldehído al 2% en tampón cacodilato 0.1M, pH 7.2-7.4 y procesadas para su estudio microscópico electrónico de transmisión y de barrido según la técnica convencional.

Resultados y Discusión:

En dorada, hemos identificado eritrocitos jóvenes y maduros circulantes (figura 1), los cuales se caracterizan por poseer forma redondeada o alargada y una superficie celular lisa. Sus características ultraestructurales son semejantes a las descritas en otros teleósteos, destacando la presencia de vesículas claras en el citoplasma. No hemos observado la banda marginal de microtúbulos descrita en otras especies (ESTEBAN y col., 1989). Los trombocitos (figura 1) presentan una superficie celular lisa con algunas depresiones que podrían corresponderse con la red de canalículos de conexión superficial. No hemos observado gránulos citoplasmáticos como los descritos en trombocitos de otros peces (DAIMON y UCHIDA, 1985). Los linfocitos (figura 2) varían en tamaño y se caracterizan por presentar numerosas prolongaciones cortas. El núcleo ocupa casi toda la célula y el citoplasma forma un fino halo a su alrededor. Las células plasmáticas

son escasas en sangre circulante. Presentan forma redondeada y en citoplasma destaca la presencia de numerosas cisternas dilatadas retículo endoplasmático rugoso con un contenido de media electronodensidad. Los monocito-macrófagos (figura 3) poseen forma variable debido a su tendencia a formar pseudópodos. En el citoplasma observan lisosomas y vesículas claras. En granulocitos, la presencia de gránulos específicos nos ha permitido identificar tres tipos celulares distintos: Neutrófilos (figura 4), eosinófilos (figura 5) y basófilos (figura 6), de modo semejante a lo descrito en lubina (MESEGUER y col. 1990). Sin embargo, a diferencia de lo descrito en esa misma especie observamos la presencia de dos poblaciones de gránulos en los leucocitos neutrófilos y basófilos y de tres en los granulocitos eosinófilos, cuya ultraestructura es diferente de la descrita para este tipo celular en otras especies (BIELEK, 1980; MESEGUER y col., 1990).

Figura 1: Eritrocitos (E) y trombocitos (T). X1800.

Figura 2: Linfocitos (L). X1800.

Figura 3: Monocito-macrófago. X6500.

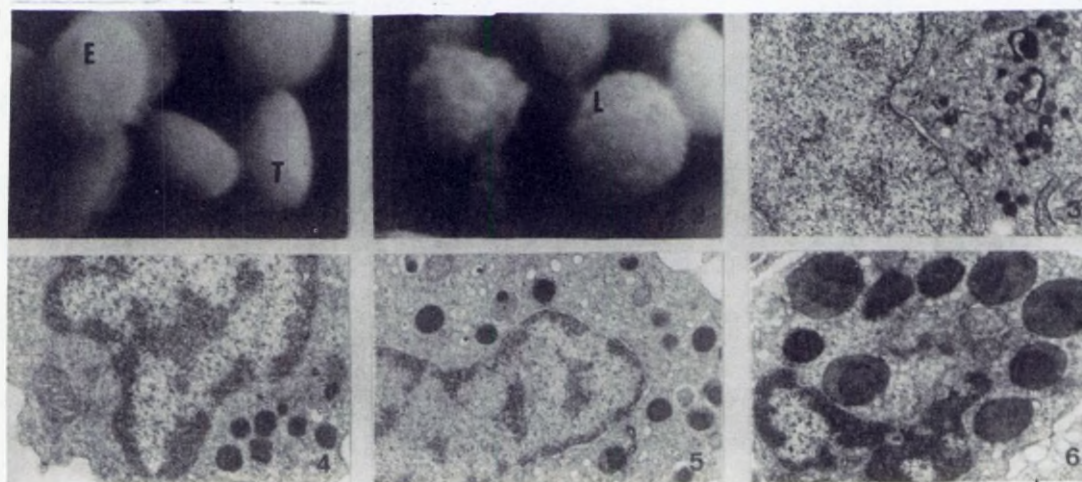
Figura 4: Granulocito neutrófilo. X8000.

Figura 5: Granulocito eosinófilo. X8000.

Figura 6: Granulocito basófilo. X10000.

Bibliografía

- BIELEK, E (1980). Zool. JB. Anat. Bd., 101: 105-121.
 DAIMON, T y UCHIDA, K (1985). J. Anat., 141: 193-200.
 ESTEBAN, MA; MESEGUER, J; GARCIA AYALA, A Y AGULLEIRO, B. (1989). Arch. Histol. Cytol., 52: 407-419.
 KUSUDA, R e IKEDA, Y (1987). Nippon Suisan Gakkaishi, 53: 205-209.
 MESEGUER, J; ESTEBAN, MA; GARCIA AYALA, A; LOPEZ RUIZ, A y AGULLEIRO, B (1990). Arch. Histol. Cytol., 53: 287-296.
 ROWLEY, AF; HUNT, TC; PAGE, M y MAINWARING, G (1988). A.F. Rowley y N.A. Ratcliffe ed., Cambridge University Press. Cambridge.



ULTRAESTRUCTURA DE LAS CELULAS DEL EXUDADO PERITONEAL DE LUBINA (Dicentrarchus labrax L.).

MESEGUER J., MUÑOZ J., ESTEBAN M.A., LOPEZ RUIZ A., AGULLEIRO B.

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR.

FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD DE MURCIA. MURCIA.

Introducción:

La importancia de las células del exudado peritoneal de peces es conocida debido a sus implicaciones en los procesos de defensa inmunológica (Ellis, 1982). Sin embargo, excepto por estudios funcionales recientes (Suzuki, 1986), la información sobre la ultraestructura y los aspectos morfofuncionales de dichas células es actualmente muy escasa. El propósito de nuestro trabajo es la caracterización y descripción ultraestructural de los diferentes tipos celulares presentes en el exudado peritoneal de lubina (Dicentrarchus labrax L.).

Material y Métodos:

Exudado peritoneal de lubina obtenido mediante punción, fué centrifugado a 1500 rpm a 4 °C durante 10 minutos. Las células obtenidas fueron procesadas para su estudio microscópico electrónico según la técnica convencional.

Resultados y Discusión:

Las células del exudado peritoneal de lubina han sido caracterizadas mediante la aplicación de los criterios indicados en estudios previos (Bodanmer, 1986), identificándose todos los tipos celulares presentes en sangre circulante aunque, la abundancia relativa de estos es variable. El tipo celular más frecuente fue el macrófago, pudiendo ser diferenciados al menos los estadios de monocito (Fig. 1), monocito-macrófago (Fig. 1) y macrófago (Fig. 2 y 3). Los monocitos se han identificado como células redondeadas cuyo tamaño es el menor de los tres tipos citados. Poseen un núcleo grande de contorno irregular y en su citoplasma aparecen escasas vesículas pequeñas de contenido electronodenso. Los monocito-macrófagos se caracterizan por su núcleo escotado o lobulado y por la

presencia de lisosomas , algunos de los cuales poseen un contenido heterogéneo. Con frecuencia varias de estas células aparecen rodeando a otros tipos celulares de citoplasma muy vacuolado (Fig. 4). Los macrófagos son grandes células provistas de largas y delgadas prolongaciones citoplasmáticas. Su núcleo aparece frecuentemente rechazado a la periferia debido a la presencia de una o mas vesículas de endocitosis de gran tamaño (Fig. 5). De acuerdo con otros autores se destaca la presencia de numerosos linfocitos y granulocitos eosinófilos (Fig. 6) (Bodammer, 1986; Suzuki, 1986), a diferencia de lo observado en salmón y trucha en los que los tipos celulares mas frecuentes son los macrófagos, los leucocitos neutrófilos y los linfocitos (Sakai, 1984).

Fig. 1: Monocito. X 3600.

Fig. 2: Monocito-macrófago. X 6500.

Fig. 3: Macrófago. X4200.

Fig. 4: Macrófagos rodeando a una célula de citoplasma vacuolado. X 2850.

Fig. 5: Macrófago con una vesícula de endocitosis de gran tamaño. X 2600.

Fig. 6: Granulocito eosinófilo. X 4300.

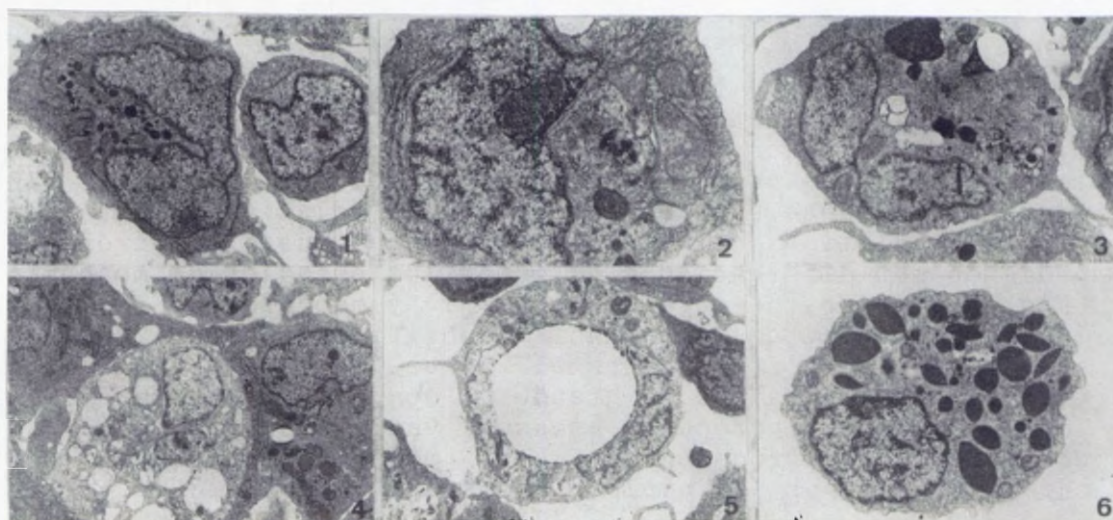
Bibliografía

BODAMMER J.E. 1986. Vet. Immunolol. Immunopathol., 12: 127-140.

ELLIS A.E. 1982. In Microbial Diseases of Fish (R.J. Roberts, ed.), pp. 1-29. New York: Academic Press.

SAKAI D.K. 1984. J. Fish Diseases, 7: 29-38.

SUZUKI K. 1986. J. Fish Biol., 29: 349-364.



VALORACION DE LOS DISTINTOS COMPONENTES NUCLEOLARES EN CELULAS DE PLANTAS SUPERIORES.

Moreno, F.J., Rodrigo, R.M., Torreblanca, J.

Departamento de Biología Celular

Facultad de Biología. Universidad de Sevilla.

Introducción: El nucleolo es un orgánulo celular presente en todos los organismos eucarióticos, y responsable de la síntesis y procesamiento del ADN ribosómico. En estos últimos años se han realizado numerosos trabajos sobre la organización estructural y distribución de los componentes nucleolares, comprobando que dichos componentes se modifican en determinadas condiciones fisiológicas y experimentales. En este trabajo se ha intentado correlacionar el estado de actividad celular con la apariencia nucleolar, con el fin de poder determinar un patrón nucleolar, bien de sus componentes estructurales o bien de sus constituyentes moleculares, que nos sirva de diagnóstico para determinar y establecer el estado de actividad funcional de la célula.

Material y Métodos: El material utilizado ha sido células meristemáticas radicales de Allium cepa en estado de crecimiento activo (proliferación), en estado de crecimiento retardado a baja temperatura (4°C), y en condiciones experimentales en presencia de un inhibidor de la síntesis de proteínas (cicloheximida, CHM). El estudio morfológico se llevó a cabo en material incluido en resina Spurr. Para la determinación de las proteínas Ag-NOR, el material fue fijado en glutaraldehído-Carnoy y embebido a baja temperatura en la resina hidrofílica Lowicryl K4M. Las secciones finas sobre rejillas se sometieron a la técnica citoquímica Ag-NOR en una etapa. La valoración cuantitativa se realizó con el programa IMAGO de análisis de imagen.

Resultados y Discusión: El nucleolo de Allium cepa muestra una morfología compacta, donde el componente granular (CG) se entremezcla con el fibrilar (CF). En este último es difícil distinguir entre los centros fibrilares y el componente fibrilar denso. Además, también se observan áreas claras de contenido homogéneo y con inclusiones, y algunos intersticios.

La tinción Ag-NOR nos permite diferenciar parte del componente fibrilar que está localizado, generalmente, alrededor de las áreas claras formando a su vez un anillo en el interior del nucleolo.

Bajo el tratamiento con inhibidores de la síntesis de proteínas se produce una segregación de los dos componentes mayoritarios nucleolares, disponiéndose el componente granular rodeando al fibrilar. Una morfología similar se obtiene retardando el crecimiento celular por la acción del frío.

La valoración de los distintos componente nucleolares nos permite observar una disminución significativa del área ocupada por las

proteínas Ag-NOR bajo el tratamiento con el inhibidor de la síntesis de proteínas CHM.

En condiciones de crecimiento retardado por la acción de bajas temperaturas, el área del componente fibrilar se incrementa debido a un aumento en la duración del periodo de transcripción. Sin embargo el área ocupada por las proteínas Ag-NOR se mantiene, indicándonos que aunque ralentizada, la actividad transcripcional continúa en estas condiciones.

	CONTROL	CHM	FRIO
Area nucleolo (μm^2)	11.52 \pm 0.87	9.90 \pm 0.96*	18.48 \pm 1.34* ^{\$}
Area CF (μm^2)	4.80 \pm 0.45	4.44 \pm 0.42	7.46 \pm 0.65* ^{\$}
Area Ag-NOR (μm^2)	3.26 \pm 0.11	0.53 \pm 0.07* ⁺	3.66 \pm 0.39
VvCF	0.41 \pm 0.016	0.45 \pm 0.001	0.40 \pm 0.001
VvAg-NOR	0.32 \pm 0.009	0.09 \pm 0.011* ⁺	0.34 \pm 0.008

*p < 0.01 comparado con el grupo CONTROL

Media \pm e.s.m.

^{\$}p < 0.01 comparado con el grupo CHM

+p < 0.01 comparado con el grupo FRIO

Bibliografía

- Goessens G (1984) Int. Rev. Cytol. 87, 107-158
- Hernandez-Verdun D (1986) Meth. Achiev. Exp. Pathol. 12, 26-62
- Jordan EG (1984) J. Cell Sci. 67, 217-220
- Moreno FJ, Hernandez-Verdun D, Masson C, Bouteille M (1985) J. Histochem Cytochem. 33, 389-399

SEPARACION CELULAR EN ORGANOS LINFOIDES DE Sparus aurata (TELEOSTEO).
IDENTIFICACION ULTRAESTRUCTURAL DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS CON ANTICUERPOS MONOCLONALES.
Navarro, V.; Rombout, J.H.W.M.; Villena, M.I.; Abad, M.E.; Quesada, J.A.

Biología Celular

Facultad de Biología. Universidad de Murcia. Murcia.

Introducción:

La diferencia esencial entre las subpoblaciones de linfocitos en peces, como en mamíferos, es la presencia de marcadores superficiales que se ponen específicamente en evidencia mediante el uso de anticuerpos monoclonales (Lobb, C.J. and Clem, L.W. 1982). En el presente trabajo se identifican dos subpoblaciones de linfocitos en bazo y riñón cefálico de Sparus aurata L. mediante el uso de anticuerpos monoclonales frente a Ig del suero específicos para células semejantes a linfocitos. B.

Material y Métodos:

Obtención de anticuerpos monoclonales (MAbs) frente a Ig del suero de dorada según una modificación de Köhler and Milstein (Goding, J.W. 1983).

Fraccionamiento celular en gradiente de Percoll al 60% a partir de suspensiones celulares de bazo y riñón cefálico de ejemplares de dorada entre 150-200 g. Las bandas resultantes fueron recogidas y procesadas para su identificación. Inmunocitoquímica ultraestructural: Las bandas con predominio de linfocitos se incubaron con WSI 5 (MAb) y se marcaron con partículas de oro de 15 nm conjugadas con goat antimouse IgG. Tras la fijación e inclusión se procedió a su estudio con microscopía electrónica.

Resultados y Discusión:

La separación celular en gradiente de Percoll nos indica la existencia de dos bandas con distinta densidad en bazo y riñón cefálico.

Mediante el estudio ultraestructural, de las células contenidas en las bandas, identificamos como eritrocitos (Fig 2 y 5) las células predominantes en la banda mas densa (nº 2) y como linfocitos (Fig 1 y 4) las células presentes en la banda menos densa (nº 1). No obstante, en la banda nº 1 del riñón cefálico aparecen tambien gran número de granulocitos (Fig 3).

El estudio inmunocitoquímico ultraestructural indica la existencia de dos subpoblaciones linfocitarias, por diferenciar entre linfocitos marcados o no superficialmente (Fig 6 y 7).

El recuento de estas subpoblaciones señala que el porcentaje de linfocitos marcados en riñón cefálico es aproximadamente del 25% y menor en el bazo, siendo comparables con los datos obtenidos por otros investigadores en carpa (Van Diepen and col, 1990).

Estos porcentajes y la especificidad del anticuerpo indican que esta subpoblación es de linfocitos semejantes a B.

La variación en la intensidad de marcaje superficial de los linfocitos en ambos órganos sugiere que la diferenciación linfoide ocurre tanto en bazo como en riñón cefálico.

Fig 1: Linfocitos del bazo (banda nº 1) x4000

Fig 2: Eritrocitos del bazo (banda nº 2) x3150

Fig 3: Linfocitos del riñón cefálico (banda nº 1) x4700

Fig 4: Granulocitos del riñón cefálico (banda nº 1) x3300

Fig 5: Eritrocitos del riñón cefálico (banda nº 2) x3150

Fig 6: Linfocito sIg positivo del bazo. x79000

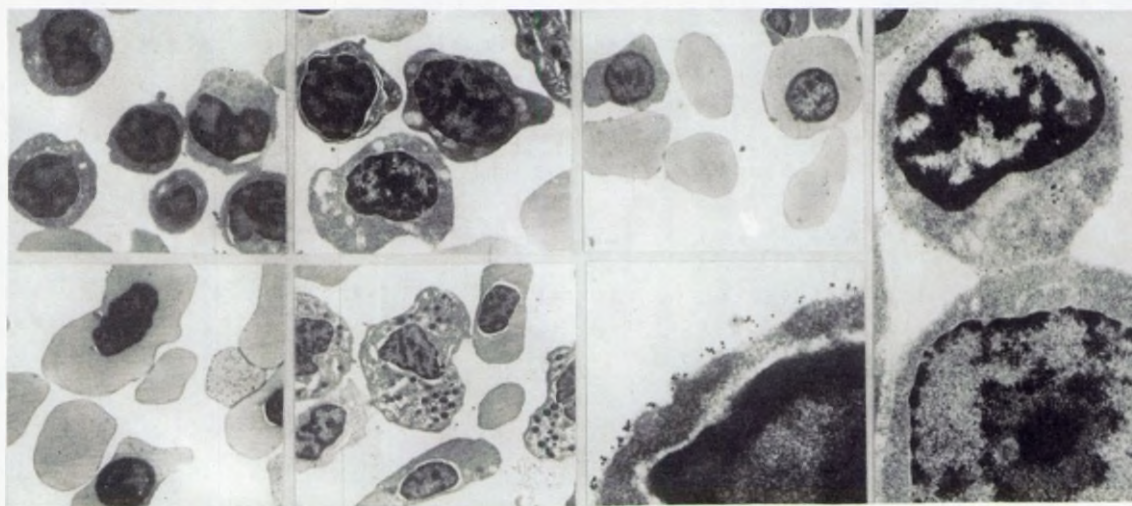
Fig 7: linfocito sIg positivo del riñón cefálico. x28000

Bibliografía:

Goding, J.W. 1983. Monoclonal antibodies: Principles and practice. Academic Press Inc. (London).

Lobb, C.J.; Clem, L.W. 1982. Fish lymphocytes differ in the expression of surface immunoglobulins. Dev. Comp. Immunol. 6: 473-479.

Van Diepen, J.C.E.; Wagenaar, G.T.M.; Rombout, J.H.W.M. 1990. Immunocytochemical detection of membrane antigens at carp leucocytes using light and electron microscopy. J. Fish Biol.



PARAMETROS ULTRAESTRUCTURALES DE LA CÁSCARA DEL HUEVO DE AVE

P. NIETO y L.J. ALBERTO

Fisiología y Biología Animal, Laboratorio de Vertebrados.
Facultad de Biología. Avda. Reina Mercedes, 6. E-41071 SEVILLA.

Introducción:

Desde que se describió la estructura fundamental de la cáscara del huevo de ave en el siglo pasado (ver TYLER, 1969; ALBERTO, 1989) se ha intentado establecer diferencias estructurales de la misma en distintos grupos de aves (TYLER y SIMKISS, 1959; BACCETTI, 1976), así como las perturbaciones que sobre dicha estructura de la cáscara ejercen algunos contaminantes (PEAKALL et al., 1973; FOX, 1976; COOKE, 1979). En ambos casos la principal dificultad reside en encontrar parámetros que estadísticamente pongan de manifiesto dichas diferencias o alteraciones. Aquí estudiamos el valor diferenciador de 11 parámetros ultraestructurales de la cáscara del huevo de cinco especies de aves Limícolas.

Material y Métodos:

Se emplearon 45 muestras de cáscara de distinto huevo repartidas por especies como sigue: (A) *Recurvirostra avosetta* (10), (H) *Himantopus himantopus* (10), (CH) *Charadrius alexandrinus* (8), (V) *Vanellus vanellus* (8), (T) *Tringa totanus* (9). De los huevos de procedencia de las muestras se conocía el volumen (VOL), el peso total de la cáscara (PC) y su espesor (E). Sobre las fotografías obtenidas con el MEB se tomaron, de cada muestra, las medidas de la Tabla I (ver TYLER y SIMKISS, 1959; COOKE, 1979 y fotos). En los casos de DM, LMP, DPI y DF el valor tomado para cada muestra fue la media de varias mediciones.

Resultados y Discusión:

Los once parámetros ultraestructurales presentan mucha variabilidad específica (Tabla I), lo que dificulta, contrariamente a lo

	PC	E	EM	EC	HCM	DM	HM	LMP	DPI	DMPI	NPS	PSP	DF	VOL	K
A	1.93 (0.01)	0.22 (7.80)	82.80 (13.79)	185.40 (7.94)	42.00 (19.67)	86.70 (11.89)	16.40 (21.16)	92.90 (7.64)	0.50 (13.92)	0.96 (9.40)	65.50 (16.62)	13.01 (26.07)	1.61 (12.14)	28.69 (6.68)	1.83 (19.60)
CH	0.55 (8.55)	0.15 (7.28)	56.88 (13.86)	135.50 (9.09)	28.38 (15.87)	64.88 (20.42)	14.63 (24.50)	43.38 (13.50)	0.45 (10.54)	0.86 (8.85)	82.88 (36.15)	13.01 (31.44)	1.15 (13.29)	8.48 (4.79)	5.89 (15.62)
H	1.38 (5.81)	0.19 (6.88)	64.90 (18.24)	172.00 (7.73)	34.30 (23.24)	100.30 (18.44)	19.50 (29.83)	75.60 (8.76)	0.56 (14.23)	1.10 (15.23)	51.22 (18.52)	12.73 (29.44)	1.34 (6.50)	20.95 (4.28)	2.29 (21.62)
T	1.18 (9.26)	0.17 (6.47)	86.22 (17.37)	132.78 (35.51)	34.11 (12.13)	84.22 (17.10)	17.89 (15.17)	79.22 (18.99)	0.53 (12.64)	0.93 (10.46)	43.50 (23.89)	9.41 (19.63)	1.31 (10.12)	20.38 (7.41)	3.24 (17.43)
V	1.41 (12.21)	0.18 (9.60)	58.88 (13.42)	169.88 (8.77)	37.13 (19.77)	60.00 (31.03)	18.75 (20.51)	84.50 (11.10)	0.43 (10.72)	0.84 (9.29)	80.75 (20.58)	11.63 (14.71)	1.56 (11.60)	26.30 (17.40)	1.49 (23.01)

TABLA I.- Media y Coeficiente de Variación, entre paréntesis, de los parámetros en las cinco especies de aves.
Notación: EM, espesor de membrana; EC, espesor de capa calcárea; HCM, altura de capa mamilar; DM, media de la distancia entre centros de mamilas; HM, altura de las mamilas; LMP, media de la longitud máxima de placas de superficie; DPI, diámetro medio, y DMPI diámetro máximo, de los poros de la capa esponjosa; NPS, n° de poros por 100 μ^2 ; PSP, % de superficie ocupada por los poros en la capa esponjosa; DF, media del diámetro de las fibras;
K= EM x VOL/ DF.

afirmado por BACCETTI (1976), diferenciar claramente mediante ellos las cáscaras del huevo de especies próximas (Fig. 1). Por idéntica razón, estos parámetros sólo podrán detectar los cambios estructurales de la cáscara muy aparentes, originados por factores que afectan a la formación de la misma, como los señalados por COOKE (1979).

Las correlaciones entre los parámetros presentan un espectro a nivel específico difícil de interpretar y diferente para cada una de las especies. En las correlaciones entre medias de parámetros y volumen medio de las especies destaca la correlación positiva entre la longitud media de las placas de la superficie con el volumen, y el diámetro de las fibras de las membranas con el volumen. Esta correlación interespecífica no se da dentro de ninguna especie con el tamaño de muestra que hemos estudiado.

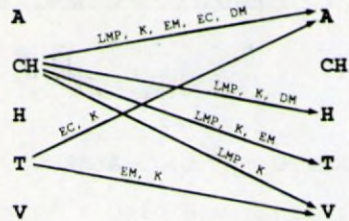
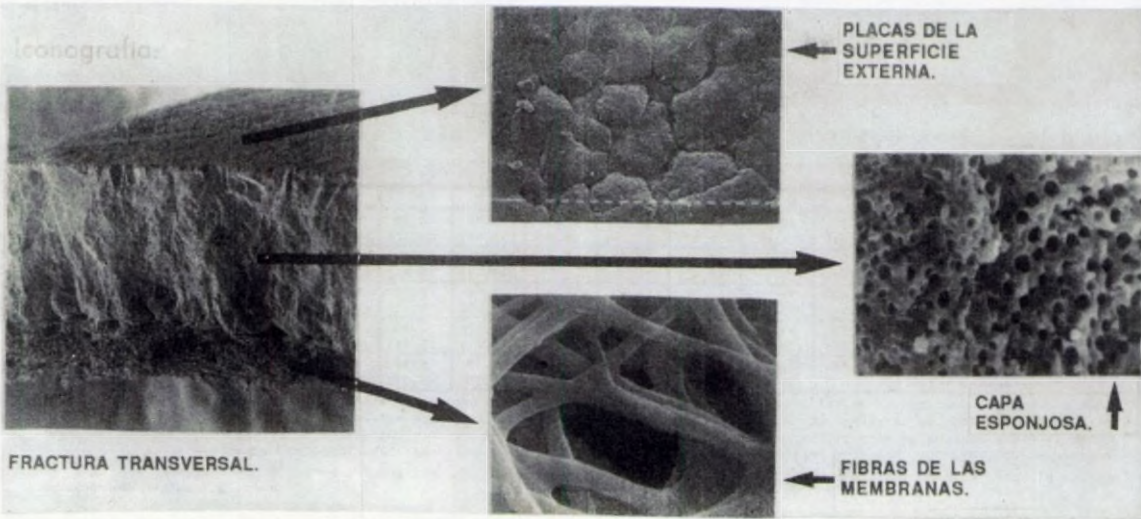


Fig. 1.- Unión de especies que presentan diferencias significativas en los parámetros indicados en la conexión.

Bibliografía

ALBERTO, L.J. (1989).- Acta IX Bienal de la RSEHN, 249-258.
 BACCETTI, B. (1976).- Monitore Zool. Ital. (N.S.), 10: 25-91.
 COOKE, A.S. (1979).- Environ. Pollut., (19): 47-65.
 FOX, G.A. (1976).- The Wilson Bulletin, 88 (3): 459-477.
 PEAKALL, D.B.; J.L. LINCER; R.W. RISEBROUGH; J.B. PRITCHARD y W.B. KINTER (1973).- Comp. gen. Pharmac., 4: 305-313.
 TYLER, C. (1969).- J. Zool. Lond., 158: 395-412.
 TYLER, C. y K. SIMKISS (1959).- Proc. Zool. Soc. Lond., 133: 201-243.



Título: Ultraestructura de la mucosa gástrica de Salmo gairdneri, Rich.

Autor(es): M.V. Ostos Garrido, M.A. Abaurrea Equisoain, M.I. Núñez Torres.

Departamento: Biología Celular

Centro: Facultad de Ciencias: Universidad de Granada.

Introducción: El propósito del presente trabajo es determinar mediante las técnicas adecuadas las características citoquímicas y ultraestructurales de los tipos celulares constituyentes de la mucosa gástrica de la trucha arco iris y en particular las características de las células implicadas en la producción de jugo gástrico.

Las glándulas gástricas que se localizan sólo en la parte proximal del estómago, también denominada cuerpo (Reifel y Travill, 1978), aparecen constituidas por un tipo celular único, las células oxinticopépticas (Ito y Winchester, 1967) productoras de ácido clorhídrico y pepsina. Las células mucosas superficiales contienen mucosustancias neutras que coexisten con mucosustancias ácidas, fundamentalmente sialomucinas.

Material y Métodos: Para la realización del presente trabajo utilizamos ejemplares jóvenes de trucha arco iris que tras mantenerlos durante algún tiempo en cubas de fibra de vidrio, fueron sacrificados por decapitación previa anestesia con MS 222 Sandoz. Porciones de estómago (regiones del cuerpo y pilórica) se fijaron por inmersión en Bouin durante 24 horas para el estudio histoquímico que se realizó sobre secciones de 8-10 micras obtenidas de material incluido en Paraplast.

Las muestras destinadas al estudio ultraestructural fueron fijadas durante cinco horas a 4°C en glutaraldehído al 4% en tampón cacodilato y postfijadas con O.O.³⁴ al 1,5 % en el mismo tampón. Tras deshidratación en acetonas de concentración creciente se incluyeron en Epon 812. Los cortes ultrafinos se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo.

La porción gástrica del tracto gastrointestinal de la trucha aparece constituida por dos regiones diferentes que, de acuerdo con otros autores (Reifel y Travill, 1978) denominamos regiones del cuerpo y pilórica. En ambos casos histológicamente se puede hablar de las cuatro capas características del estómago de los vertebrados: mucosa, submucosa, muscular propia y serosa.

En la región del cuerpo la mucosa gástrica tiene carácter glandular y se caracteriza por la presencia de glándulas tubulares simples constituidas por células que se disponen en una capa en torno a la luz, carentes de PAS positividad en su citoplasma a diferencia de las células columnares que forman el epitelio de revestimiento.

La región pilórica carece de este tipo de glándulas y las células epiteliales de revestimiento muestran en su citoplasma la presencia de mucosustancias neutras y ácidas tanto del tipo de las sialomucinas como sulfomucinas.

Células superficiales (Fig. 1). Estas células de forma prismática revisten toda la superficie interna del estómago. El núcleo de contorno irregular y situado en el polo inferior de la célula muestra nucleolo bien desarrollado. Todo el citoplasma supranuclear aparece

ocupado por numerosos gránulos de naturaleza mucóide de forma y tamaño variables que pueden aparecer como elementos formes independientes o formando grandes masas que se visualizan liberando su contenido a la luz gástrica. En zonas próximas al núcleo y también en la vecindad de los gránulos, pueden verse complejos Golgi formados por sáculos y vesículas que se disponen en áreas más o menos circulares. Se ven también perfiles de retículo endoplasmático rugoso. En las membranas plasmáticas laterales existen interdigitaciones. No presentan microvellosidades en su borde apical.

Células oxinticopépticas (Fig. 2 y 3). Las células que tapizan las glándulas presentan una estructura compleja en la que se asocian características de las células principales y parietales de mamífero por lo que se denominan oxinticopépticas (Ito y Winchester, 1967). En el citoplasma de dichas células encontramos un sistema tubular vesicular de membranas lisas bien desarrollado. Esta red participa en la elaboración del ácido clorhídrico en la que estaría igualmente implicada una ATPasa (Kasbekar y Durbin, 1965) lo que justificaría la elevada proporción de mitocondrias que observamos. Este mismo tipo celular secreta las proteasas del jugo gástrico que son sintetizadas en el retículo endoplasmático rugoso, que aparece constituido por cisternas paralelas formando apilamientos que en ocasiones ocupan un volumen importante. Otro elemento citoplasmático importante son los gránulos de zimógeno de forma esférica y tamaño variable que muestran una moderada densidad a los electrones.

El proceso de producción de enzimas pépsicas es en todo similar al descrito para las células principales de las glándulas fúndicas de mamíferos (Stephens and Pfeiffer, 1968) y por las células oxinticopépticas descritas por Sedar, 1961. En el borde apical las células poseen una serie de expansiones de su membrana plasmática de forma y tamaño irregular.

Bibliografía: Ito, S y Winchester, R, 1967. "Anatomic structure of the gastric mucosa". En Handbook of Physiology, section 6. Alimentary canal Washington. American Physiological Society.

Kasbekar, D.K. y Durbin, 1965. "An adenosine triphosphatase from frog gastric mucosa". Biochim. Biophys. Acta., 105:472-482.

Reifel, C.W. y Travill, A.A., 1978. "Structure and carbohydrate histochemistry of the stomach in eight species of Teleost". J. Morph. 158:155-168.

Stephens, R.I. y Pfeiffer C.J., 1968. "Ultrastructure of the gastric mucosa of normal laboratory ferrets".

J. Ultrastructure. Res., 22,45-62.

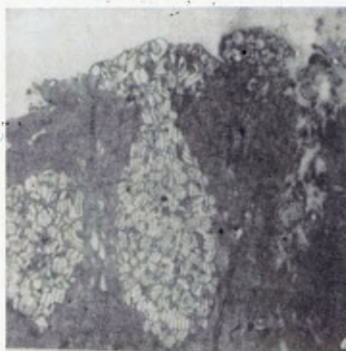


Figura 1



Figura 2

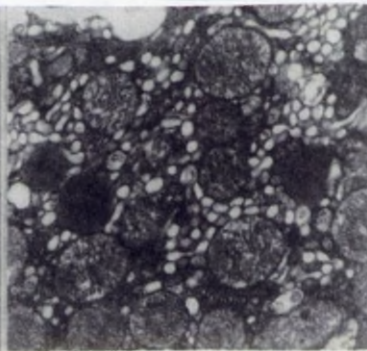


Figura 3

CARACTERIZACION MORFOLOGICA DE LA MUCOSA LARINGEA DE RANA PEREZI

L.M. Pastor, J. Gallego-Huidobro, A. Calvo

Biología Celular

Facultad de Medicina. Universidad de Murcia.

Introducción:

Los estudios ultraestructurales del epitelio de las vías aéreas de vertebrados no mamíferos han sido realizados principalmente en aves (1) y reptiles (2, 3, 4) siendo muy escasos en anfibios donde sólo se conoce la ultraestructura del urodelo Hynobius nebulosus (5). En el presente trabajo se realiza una descripción a nivel ultraestructural del epitelio laríngeo del Anuro Rana perezi y se comparan dichos resultados con los encontrados en otros vertebrados.

Material y Métodos:

Para microscopía electrónica de transmisión las muestras de laringes de individuos adultos de Rana perezi (n=10) fueron fijadas en glutaraldehído (2.5%) y postfijadas en tetraóxido de osmio, deshidratadas en acetona e incluidas en Epon 812. Las muestras utilizadas para microscopía electrónica de barrido fueron fijadas de igual forma, deshidratadas también en acetona, sometidas a punto crítico y metalizadas con oro.

Resultados y Discusión:

Con microscopía de barrido la superficie de la laringe muestra sólo células con morfología poligonal, marcados límites celulares y microvellosidades cortas apicales. En la porción distal de la laringe se aprecian también entre estas células orificios circulares, probablemente aperturas glandulares.

La microscopía de transmisión permite identificar tres tipos celulares en el epitelio laríngeo: Células secretoras, basales y endocrinas, así como numerosos nervios intraepiteliales. Las células secretoras se presentan en la porción distal laríngea formando glándulas tubulares simples. Estas células presentan abundantes microvellosidades apicales y un citoplasma con abundantes gránulos de secreción de variable estructura, siendo los más frecuentes (sobre todo en las glándulas) los que presentan una estructura mielínica muy semejante a la de los cuerpos laminares de los neumocitos ti-

po II (Fig. 1 A). Las células endocrinas son más electrolúcidas que las anteriores y muestran en su citoplasma pequeños gránulos de secreción de unos 80 nm de diámetro con halo periférico claro y centro denso (Fig. 1 B). Entre estas células se pueden localizar nervios intraepiteliales que portan en su interior vesículas claras y otras de halo periférico y centro denso (Fig. 1 C).

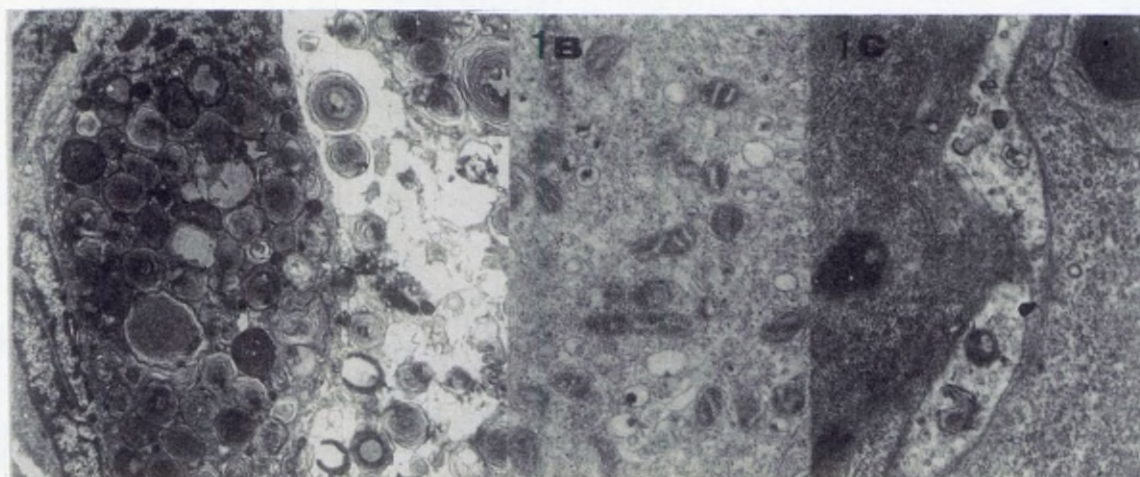
Los resultados indicados permiten deducir que, desde el punto de vista ultraestructural, el epitelio de la laringe de *Rana perezi* se presenta con una morfología muy similar a la encontrada en los Lacértidos y Ofidios (3, 4,5) diferenciándose claramente del otro Anfibio estudiado hasta la fecha: *Hynobius nebulosus* (6).

En conclusión, puede detectarse en las vías aéreas de vertebrados tetrápodos dos patrones morfológicos epiteliales que difieren esencialmente en el tipo de célula secretora. Con gran probabilidad las secreciones producidas tendrán composición distinta y quizás funciones diferentes adecuadas a las necesidades de cada grupo de animales.

Fig.1-1A: Célula secretora, 1B: Célula endocrina, 1C: Nervios intraepiteliales.

Bibliografía:

- 1.-Walsh C. and McLelland J., 1974. Acta Anat. 89, 412-422.
- 2.-Pastor L.M. et al., 1987. J. Anat. 153, 171-183.
- 3.-Pastor L.M. et al., 1988. J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 20 (1), 25-36.
- 4.-Pastor L.M., 1990. J. Anat. 172, 47-57.
- 5.-Matsumura H. and Setoguti T., 1986. J. Electron Microscop. 35 (1), 66-76.



ESPECTRO DE FRECUENCIA DE LOS DIAMETROS DE LAS FIBRAS DEL NERVIÓ OP- TICO DE RATAS CRIADAS EN OSCURIDAD TOTAL.

Pizarro Celis, C; Mompeó Corredera, B; Sánchez Salgado, G; Arias
Carrasco, B. y González-Valverde, P.

PATOLOGIA Y CLINICAS HUMANAS.

FACULTAD DE MEDICINA. UNEX.

Introducción:

Se ha descrito que las fibras del nervio óptico presentan diámetros de diferente calibre. Las hipótesis que intentan explicarlo se basan: 1. Las fibras nerviosas experimentan un aumento de su diámetro durante el desarrollo (2). 2. El diámetro de las fibras estaría en relación con el tipo de célula ganglionar retiniana de la que procede (4). Basándonos en estos resultados se ha planteado el presente estudio desde la hipótesis de que factores externos, como las condiciones de luz y oscuridad, puedan provocar modificaciones funcionales durante el desarrollo que se traducirían en alteraciones del calibre de sus axones.

Material y Métodos:

Se han utilizado nervios ópticos de ratas, de diferentes edades, a las que se ha mantenido en condiciones de oscuridad absoluta.

El procesamiento de las muestras se realizó siguiendo la pauta habitual para M.E.T.

El cálculo de los parámetros cuantificados (diámetros totales de F.N.M., diámetros de F.N.M. excluyendo la mielina y diámetros de F.N. no mielinizadas) se realizó mediante un analizador de imagen A.M.S. VID-II.

Resultados y Discusión:

Los resultados obtenidos como consecuencia de las mediciones realizadas se encuentran reflejados en las Tablas I, II y III.

Los valores de los diámetros que obtienen la mayoría de los autores en el periodo comprendido entre el nacimiento y los tres años de edad oscilan entre las 0,11 y 0,6 μm . Nuestros datos, a su vez, revelan que los diámetros totales dan valores de 0,1 y 1,5 μm y de 0,1 y 1,1 μm en fibras desprovistas de la cubierta mielínica en un periodo comprendido entre el nacimiento y los 120 días de vida postnatal.

Si las dimensiones de los diámetros estuviesen en relación con el tipo celular al que pertenecen, nuestros hallazgos parecen revelar que la población celular que predomina durante el desarrollo es la de tipo alfa con mayor talla y gruesos axones, existiendo la posibilidad de

que la reducción fisiológica de su número se produzca por un proceso de muerte celular que afecte selectivamente a la población de tipo pequeño o delta. Al comprobar, sin embargo, que a partir de los 15 días la reducción del número de axones es inapreciable, hemos de desechar esa hipótesis y pensar que las dimensiones de los diámetros se deben más bien al crecimiento que experimentan durante el desarrollo.

Creemos que el desarrollo de los animales en oscuridad absoluta modifica el crecimiento en grosor de las fibras nerviosas manteniéndose una distribución fundamentalmente unimodal y existiendo una gran proporción de fibras de mediano calibre a la vez que se contabiliza escasa proporción de fibras gruesas, estas conclusiones son concordantes con las de Fukuda y cols., (1982) y Reese (1987) obtenidas en los nervios ópticos de ratas criadas en condiciones controladas.

Bibliografía:

1. RHOADES, R.W. y Cols., (1979). J. Comp. Neurol. 1986:491-504.
2. CIMA, C. y Cols., (1982). J. Embryol. Esp. Morph. 72:225-249.
3. KIRBI, M.D. y Cols., (1982). J. Compar. Neurol. 211:318-327.
4. WILLIAMS, R.W. y Cols., (1983). J. Neurosci. 2(8):1554-1564.
5. STONE, J. y Cols., (1972). Exp. Brain. Res. 13:498-503.

ESTUDIO MICROANALITICO Y ULTRAESTRUCTURAL DEL CONTENIDO LISOSOMAL DE LAS CELULAS DIGESTIVAS DEL HEPATOPANCREAS DE MOLUSCOS BIVALVOS
M. Poquet; J. Amor; M.G.Bozzo; J.R.Ferrer; J. García Valero;E. Ribes; E. Sagrista; M.Durfort

Unitat de Biologia Cel.lular

Facultat de Biologia.Universitat de BarcelonaAv.Diagonal-645,08071-Barcelona

Introducción: En los moluscos marinos se han detectado mecanismos de aislamiento de metales en tipos celulares especializados en distintos órganos. Las células que asumen dicha función utilizan tres vías de detoxificación: unión de proteínas citosólicas, secuestro en vesículas o formación de concreciones minerales (FOWLER y GOULD,1988).

En los moluscos bivalvos la glándula digestiva está formada por células que se hallan constituidas por células digestivas, células secretoras, células flageladas y células indiferenciadas.

El objetivo de este estudio se centra en la localización intracelular de elementos metálicos y las posibles vías de captación en las células de la glándula digestiva

Material y Métodos: Se han estudiado distintos ejemplares de moluscos bivalvos de las especies Tapes decussatus y Ostrea edulis procedentes del Delta del Ebro. El hepatopáncreas se ha sometido a una doble fijación con paraformaldehído 2% y glutaraldehído 2,5% y posteriormente tetróxido de osmio 1%. Se han incluido en resina Spurr, si bien las muestras destinadas al estudio microanalítico no han sido osmificadas y se han incluido además en resina Lowicryl. Los cortes ultrafinos montados en rejilla de Al o Ti se han analizado con un sistema Kevex incorporado a un microscopio Hitachi 800MT

Resultados y Discusión: La distribución de los tipos celulares varía en el hepatopáncreas de las dos especies estudiadas, si bien las células secretoras caracterizan por los numerosos gránulos de secreción y el desarrollo del complejo de Golgi. En la zona apical, los distintos tipos de células presentan uniones septadas y desmosomas, así como microvilli y algunos cilios. Las células digestivas de ambas especies poseen numerosos lisosomas y cuerpos residuales que en ejemplares sometidos a variaciones de temperatura y salinidad provocan degeneración celular (FOWLER y GOULD,1988). El análisis cualitativo del contenido lisosómico revela la existencia de P,S,Cl,Ca,Fe,Cu y Zn analizándose los elementos metálicos exclusivamente en el interior de los lisosomas, mientras que el P,S, y Cl es similar a otras zonas del citoplasma. La presencia de Ca, ligeramente incrementado en presencia de Fe, no alcanza los niveles que se han descrito en lisosomas de riñón de otras especies de bivalvos, donde llegan a constituir concreciones de tipo mineral

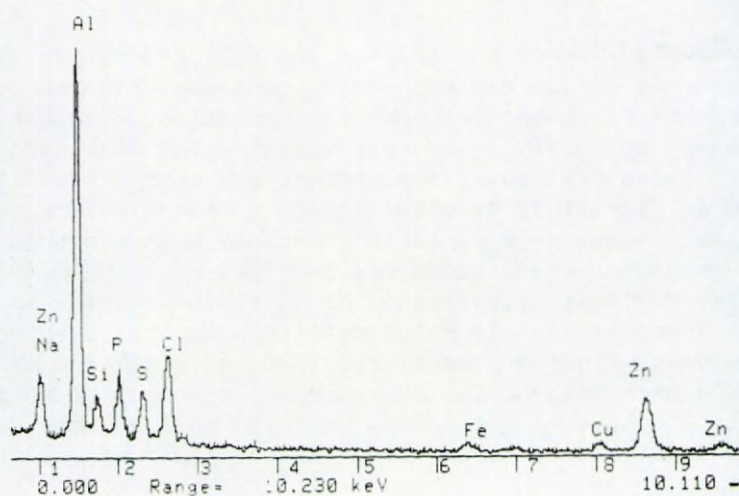
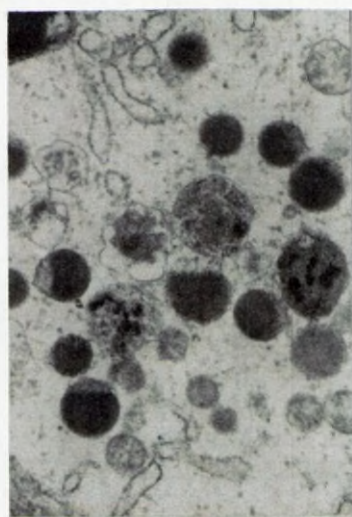
(FOWLER y GOULD),1988).

El análisis de las distintas zonas del citoplasma no revela la presencia de elementos metálicos. De la misma forma se observa una buena preservación de las estructuras membranosas y no se detecta ninguna patología en los tipos celulares estudiados.

A diferencia de otros grupos de moluscos, la composición de gránulos intralisosómicos en las especies estudiadas indica que las células digestivas del hepatopaneas intervienen, además de los procesos de digestión intracelular, en los mecanismos de secuestro y aislamiento de elementos inorgánicos que contribuyen a preservar la funcionalidad de las células y los niveles basales de todo el organismo.

Bibliografía

BALLAN-DUFRANCAIS,Ch; JEANTET,A.;FEGHALI,CH. Biol. Cell,53,283-292 (1985)
FOWLER,B.; GOULD,E. Mar.Biol.97, 207-216 (1988)
HENRY, B.A.Vie Mar. 6, 17-24 (1984)



DETECCION DE CRISTALES DE MERCURIO A NIVEL TISULAR EN LA OSTRA
(Crassostrea gigas)

M. Poquet; M.G. Bozzo; E. Sagrista; J. Amor; J. Ferrer; J. Garcia
Valero; E. Ribes; M. Durfort

Unitat de Biologia Cel.lular

Fac. de Biologia. Universitat de Barcelona. Diagonal-645. 08071
Barcelona

Introducción: Los moluscos bivalvos desarrollan distintos mecanismos de detoxificación de contaminantes inorgánicos que posibilitan la exposición tolerada frente a concentraciones relativamente elevadas. Ciertos metales pesados son necesarios a bajas concentraciones (como el Cu y el Zn) mientras que algunos como el Cd, Pb y Hg pueden alcanzar niveles letales.

Debido a la importancia económica de algunas especies de bivalvos el estudio de la incorporación de contaminantes y sus efectos en los tejidos son de vital importancia. En este trabajo se estudia la composición de cristales detectados en los tejidos de la ostra y algunos de los efectos tóxicos en ciertos tipos celulares.

Material y Métodos:

Se han estudiado 10 ejemplares de la especie Crassostrea gigas procedentes del Delta del Ebro. Fragmentos de distintos órganos indicadores como la gónada, la branquia y el manto se han procesado para su estudio al MET y MEB. Para realizar el estudio de la composición elemental, una parte de las muestras no han sido osmificadas. El estudio microanalítico se ha realizado con un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 840 con un sistema de análisis de energías dispersivas Link Systems (An 10000)

Resultados y Discusión:

En las observaciones realizadas con microscopía electrónica de barrido se han detectado formaciones cristalinas de morfología variable, en los intersticios tisulares de todos los órganos estudiados, habiéndose utilizado para su detección sistemática la señal de electrones retrodispersados ("backscattered").

El estudio microanalítico de los cristales ha revelado una composición elemental de Hg y Cl. En otras áreas del tejido se detecta P, S y Ca, elementos habituales en las muestras biológicas. El estudio ultraestructural de los tipos celulares de los distintos tejidos en los ejemplares contaminados revela alteraciones, especialmente a nivel de los cilios de la branquia y de los espermatozoides de la gónada. En las células reproductoras se detectan alteraciones a nivel del flagelo y del acrosoma. Estos dos

órganos constituyen dos de las principales vías de filtración que presentan los bivalvos y en consecuencia, presentan mayor número de cristales. Algunas de estas alteraciones se han detectado en otros ejemplares que no presentaban cristales.

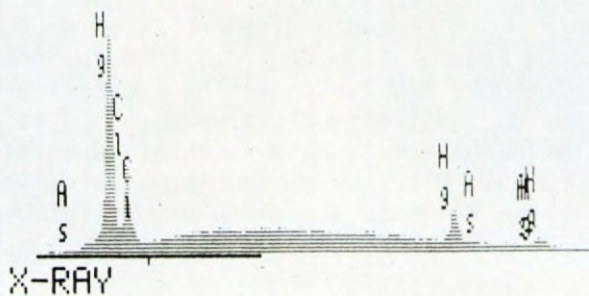
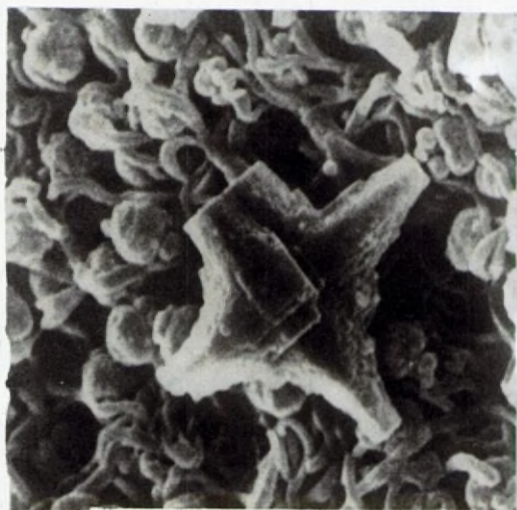
Si bien las técnicas analíticas y los efectos tóxicos de contaminantes como el mercurio son menos conocidos debido a su letalidad, podría esperarse que al igual que ocurre con otros contaminantes como el cadmio, variaciones de salinidad y temperatura den como resultado diferentes niveles de acumulación de los elementos contaminantes (FRAZIER,1983).

El nivel de inserción de los cristales en algunas áreas del tejido indica una persistencia de dicho elemento en el medio, si bien no podemos establecer una correspondencia unívoca entre la localización del mercurio intratisular y las alteraciones morfológicas detectadas, ya que pueden ser de naturaleza adaptativa o deberse a otros tipos de patología.

Bibliografía

FRAZIER, J.M.; GEORGE, S.G. Mar. Biol. 76, 55-61 (1983)

WHITTAKER, S.; SMITH, D.; FOSTER, J. Histochem. Cytoche. 38, 823-827 (1990)



CAMBIOS MORFOLOGICOS EN LA SUPERFICIE DE EXPLANTES DE PROSTATA VENTRAL DE RATA EN CULTIVO DE TEJIDOS: INFLUENCIA DE LA PROLACTINA.

ROMERO, L.; MUÑOZ, C.; LOPEZ, A.; VILCHES, J.

Biología Celular y Anatomía Patológica.

Facultad de Medicina. Universidad de Cádiz.

Introducción: El papel de los andrógenos en la patología tumoral prostática ha sido estudiado por muchos autores durante los últimos 50 años, siendo considerados como el factor más importante en la carcinogénesis prostática. Además, en las últimas dos décadas, algunos autores consideran la actuación de otros factores hormonales que ejercen su acción solos o en colaboración con la testosterona. En este trabajo estudiamos la acción de la prolactina en cultivo de explantes usando ratas Wistar como modelo experimental.

Material y Métodos: Se sacrificaron 15 ratas de 375 grs de peso y se extrajeron sus próstatas en condiciones estériles. Los cultivos se llevaron a cabo en medio RPMI-1640 suplementado con FCS al 10% y P-S al 4%. Se añadió prolactina ovina a concentraciones de 1 ui/ml de medio, 0'1, 0'01, 0'001 y 0'0001 ui/ml. Además, se realizaron dos cultivos controles con la concentración más alta de disolvente hormonal y con medio suplementado. El medio de cultivo se cambió cada dos días y los explantes fueron sacrificados a los 4, 7, 10 y 14 días. Se realizaron microfotografías con un microscopio electrónico de barrido JEOL 820.

Resultados y Discusión:

En todos los cultivos observamos un óptimo crecimiento durante los primeros 7 días, incluyendo los cultivos controles. Tras dos semanas, se observó una apreciable regresión en todos los explantes a concentraciones de 1 y 0'1 ui/ml. Por otra parte, los explantes sometidos a concentraciones de 0'01, 0'001 y 0'0001 ui/ml, sobrevivieron hasta el final de los cultivos (alrededor de 1 mes). El cultivo control se comportó de forma similar a este segundo grupo.

Es significativo que el crecimiento de células en monocapa derivadas de los explantes fué normal en todos los cultivos hasta el final de la experiencia. Los efectos inhibidores de la prolactina a concentraciones de 1 y 0'1 ui/ml, descritos por algunos autores, fueron sólo evidentes en los explantes durante la segunda semana.

El estudio con MEB permitió observar cambios morfológicos en la superficie de los explantes asociados a las distintas concentraciones de prolactina. A concentraciones de 1 ui/ml se aprecia una notable desorganización del recubrimiento celular, con células de distinta morfología, vacuolizaciones en su membrana y pérdida de las uniones intercelulares.

Este patrón se repitió también a concentraciones de 0'1 ui/ml en intensidad decreciente.

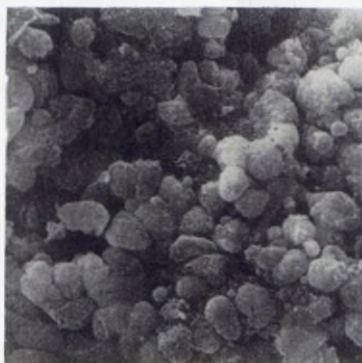
Es a la concentración de 0'01 ui/ml cuando se observa una mayor proliferación celular, con aspecto morfológico más regular y formación de estructuras de aspecto epitelial con uniones intercelulares. A concentraciones de 0'001 y 0'0001 ui/ml se aprecia una regularidad en todo el recubrimiento del explante, con uniones intercelulares bien definidas y aparición de microvillis y fenómenos de secreción en la superficie celular.

Bibliografía:

HAIM,M.; KAVER,I.; LEWYSHON,O.; AYALON,D.: The role of increased prolactin levels under GnRH analogue treatment in advanced prostatic carcinoma. Cancer, 61: 2187-2191, 1988.

MUTKA,M.W.: Polypeptide hormones and the prostate. The Prostate Cell: Structure and Function, Part B, 63-68, 1981.

HURKADLI,K.S.: Involvement of prostate regulation of serum levels of FSH, LH and prolactin in male rats. The Prostate,9:411-416, 1986.



Superficie explante prolactina 0.1 ui/ml. MEB (x1700).



Superficie explante prolactina 0.01 ui/ml. MEB (x3400).



Superficie explante prolactina 0.0001 ui/ml.(x5000).

Contribución de la Microscopia Electrónica de transmisión al diagnóstico de la Peste Equina Africana.

Rubio, C*, Cubillo, A*, Hooghuis, H* y Marcotegui, M.A*

*Laboratorio de Sanidad y Producción Animal, Algete

** INIA Dpto. de Sanidad Animal, CIT Madrid

Introducción: La Peste Equina Africana es una enfermedad infecciosa, no contagiosa, transmitida por artrópodos hematófagos, causada por un virus con RNA de doble cadena de la familia Reoviridae, género Orbivirus, con nueve serotipos diferentes conocidos, que afecta a caballos, mulos y équidos salvajes. En España se han producido últimamente cuatro brotes consecutivos de la enfermedad, el primero en la región Centro en 1987 y los tres restantes en Andalucía los años 1988, 1989 y 1990. Los animales enfermos se sacrifican y a los sanos que están en la zona afectada se les vacuna para prevenir la difusión de la enfermedad. Para ello, hay que conocer el serotipo del virus causal.

Material y Métodos: Muestras: Bazos y sueros de caballos muertos, sospechosos de haber padecido la enfermedad. Métodos de diagnóstico: Inoculación de macerados de bazo en cultivos celulares Vero y MS para multiplicación y aislamiento del virus. El medio de los cultivos con efecto citopático (ECP) específico se usa como antígeno frente a los 9 serotipos del virus en una sueroneutralización. Las células de cultivos con ECP se incluyen en EPON-Araldita. Los sobrenadantes de cultivos con ECP se usan para hacer tinción negativa con PTA 2% y para IME en fase sólida o de inmunocomplejos frente a los 9 serotipos del virus.

Resultados y Discusión: La inoculación en cultivos celulares requiere dos o tres pases por las células para tener evidencia de ECP específico. Posteriormente se realiza la sueroneutralización frente a cada uno de los 9 serotipos, sobre tapices celulares en microplacas de 96 pocillos. El antisuero que neutraliza la infección del tapiz con sobrenadante de los cultivos con ECP es el que corresponde al del virus causante del brote, que en el caso nuestro fue del serotipo 4.

En la observación al ME de los sobrenadantes de cultivos con ECP por tinción negativa, se detectaron partículas víricas aisladas o formando pequeños grupos, cuya morfología correspondía a la de los virus del género Orbivirus. Para obtener mayor concentración de partículas víricas, se realizó la IME en fase sólida sobre la rejilla frente a los 9 serotipos. En la rejilla

recubierta con antisuero tipo 4 se observó una concentración alta de partículas víricas, formando pequeños grupos. Estas partículas tienen parcialmente enmascarada su morfología y están unidas entre sí por puentes de anticuerpos, indicando la positividad de la inmunoreacción. La observación de los inmunocomplejos formados previamente, al mezclar sobrenadante de cultivos con ECP y antisuero tipo 4, pone de manifiesto la presencia de grupos de virus incluidos en una matriz de anticuerpos. En ocasiones, se incluyen en estos inmunocomplejos unos túbulos celulares alargados que están asociados a las áreas de replicación vírica en el citoplasma celular.

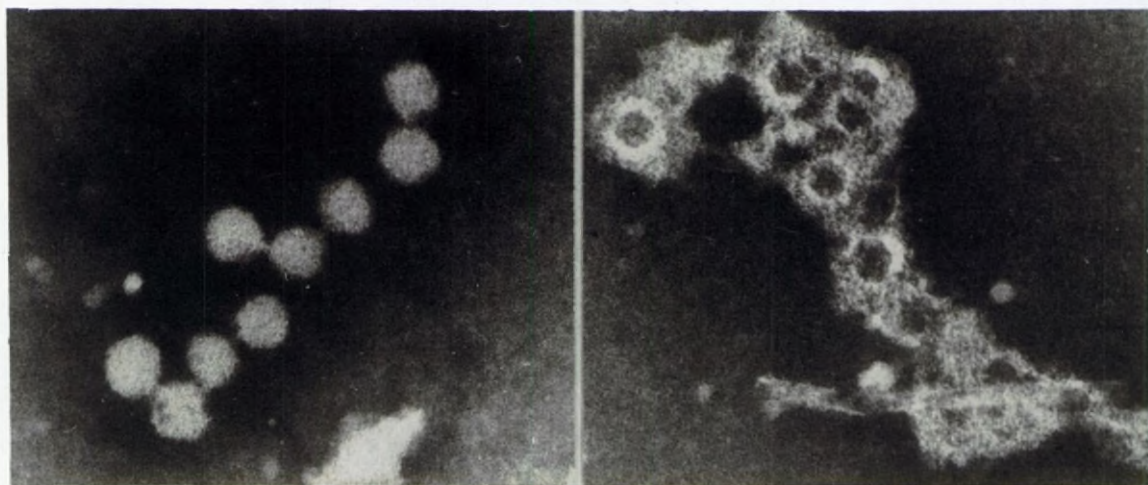
La realización de un diagnóstico rápido y seguro es fundamental para controlar la difusión de esta enfermedad. La ME-IME puede mejorar en rapidez a la sueroneutralización, pero está superada por la técnica ELISA para detección de antígeno o anticuerpos, desarrollada recientemente. En definitiva, consideramos que la ME es técnica válida para detectar y tipificar el virus de la PEA y de utilidad para resolver casos dudosos de diagnósticos obtenidos por otras técnicas.

Bibliografía:

Brenner, S. y Horn, R.W. (1959). Biochim. biophys. Acta. 34, 103-110.

Breese, S.S., Ozawa, Y. and Dardiri, A.H. J. Am. Vet. Med. Ass. 155, 391-400.

Doane, F.VD and Waterson, A.P. (1980) En "Electron microscopy in Human Medicine" Vol. 3. McGraw Hill, New York.



ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE LA BARRERA HEMATOTÍMICA: CELULAS EPITELIORETICULARES Y MACROFAGOS COMO RESPONSABLES DE LA INMUNOCOMPETENCIA DE LOS LINFOCITOS T.

J. Ruiz-Sánchez, F. Marín-Girón, F. Ojeda-Barceló, V. Puyet-Salto.

Biología Celular y Genética.

Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga.

Introducción: La barrera hematotímica es una especialización de la red tridimensional de las células epitelioreticulares que son responsables de crear el adecuado microambiente para la maduración de los linfocitos T. Estas células epitelioreticulares, ricamente organizadas, forman una vaina que rodea externamente a la pared endotelial de los vasos sanguíneos (Clark, 1963; Raviola y Karnowsky, 1972). Esta vaina celular continua, sólo se interrumpe en aquellas zonas perivasculares en las que el endotelio, con su membrana basal, contacta directamente con el citoplasma de células típicamente macrofágicas.

Material y Métodos: Se ha estudiado a microscopía tanto óptica, especialmente en cortes semifinos, como electrónica, el timo de perros Beagle desde estadios muy primitivos del desarrollo prenatal, hasta etapas perinatales.

Para microscopía óptica, se empleó como fijador una mezcla de alcohol y formol con glucosa isotónica. Se incluyeron los bloques en metacrilato y los cortes histológicos obtenidos, de 3 μ m de grosor, se tiñieron con Giensa.

Los bloques para microscopía electrónica, previa fijación con glutaraldehído y tetróxido de osmio, se incluyeron en Araldita. Los cortes semifinos, de 0,5 μ m, se tiñieron con Hematoxilina de Richardson.

Resultados y Discusión: Dado que es conocido que los prolinfocitos penetran en el timo a nivel de las partes más superficiales de la corteza y salen al torrente sanguíneo en las regiones medulares convertidos en linfocitos T o inmunocompetentes, las únicas estructuras que pueden ser responsables de la maduración de los prolinfocitos o, lo que es igual, de realizar la dotación específica de los receptores o antígenos de superficie, que los caracterizan como linfocitos T, son las células epitelioreticulares y los macrófagos.

Los núcleos de las células epitelioreticulares son grandes, de perfil irregular, mostrando la cromatina finamente granular y difusa, algo adherida a la membrana nuclear. En el citoplasma de estas células, se encuentran varios tipos de inclusiones, algunas de material denso identificado como glucógeno; las formaciones vacuolares, con un material amorfo en su interior formando mucopolisacáridos. Este material, una vez procesado por estas células, pueden servir como sustrato para la formación de los antígenos de superficie de los linfocitos T, algunos de ellos bastante complejos, formados por proteínas específicas dotadas o no de grupos glico.

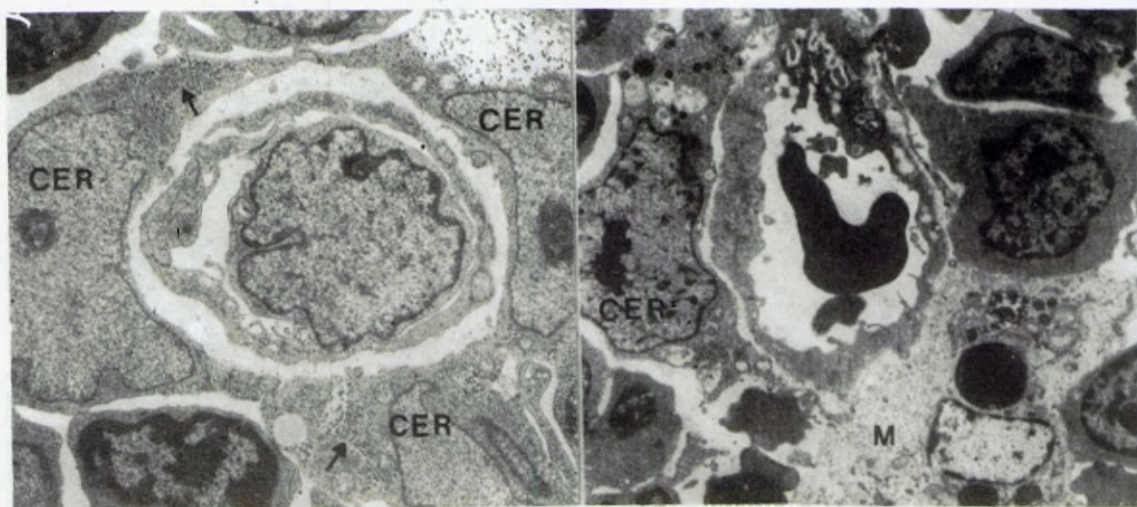
La barrera de células epitelioreticulares sólo está ausente en aquellas zonas en que los vasos contactan directamente con el citoplasma de células macrofágicas, lo que creemos puede tener una gran significación morfofuncional, dado que es conocido que en muchos procesos inmunitarios, y de forma especial durante la formación del sistema inmunitario del individuo, estas células captan todo tipo de partículas antigénicas, procesando y seleccionando este material, para presentárselo posteriormente a los linfocitos. Por tanto, estos macrófagos presentes en el timo deben participar en la incorporación de receptores por parte de los linfocitos T.

Fig. 1.- Corte ultrafino de un feto de 40 días. Se observa un capilar que tiene una célula blástica en su haz, rodeado por 3 células epitelioreticulares (CER). Estas células presentan, en el citoplasma, numerosas granulaciones oscuras (). Forman una capa continua alrededor del capilar, contactando entre sí por medio de desmosomas. x7000.

Fig. 2.- Corte ultrafino de feto de perro de 52 días. Se observa un capilar envuelto parcialmente por células epitelioreticulares (CER), ya que también está en contacto con el citoplasma de un macrófago (M) de gran tamaño. x4000.

Bibliografía:

- CLARK, S.L., Jr. The thymus in mice of strain 129/J, studied with the electron microscope. *Am. J. Anat.*, 112:1-33 (1963).
- RAVIOLA, E. and M.J. KARNOWSKY. Evidence for a blood-thymus barrier using electron-opaque tracers. *J. Exp. Med.*, 136:466-498 (1972).



EXPRESION Y DISTRIBUCION DEL RECEPTOR FcRIII (CD16) SOBRE LA SUPERFICIE DE GRANULOCITOS HUMANOS. Estudio con inmunomicroscopía electrónica de barrido.

Sanchez Arcos, E.*, Fernández-Segura, E., García López, JM., Campos, A.

*Servicio de Hematología. C. S. Virgen de las Nieves. Granada.

Departamento de Histología y Biología Celular. Facultad de Medicina. Universidad de Granada.

Introducción:

FcRIII es un receptor de baja afinidad para la Fc de inmunocomplejos IgG, que se expresa preferencialmente sobre polimorfonucleares neutrófilos (PMN) y células natural killer (1). FcRIII ha sido implicado en fenómenos de inmunoadherencia, fagocitosis y liberación de enzimas lisosomiales (2). Recientemente, el nivel de expresión y el patrón distribución del FcRIII sobre la superficie celular ha sido correlacionado con la actividad funcional de PMNs humanos (3). El objetivo del presente estudio es analizar la expresión y distribución del receptor FcRIII sobre PMNs humanos mediante inmunomicroscopía electrónica de barrido.

Materiales y Métodos:

PMNs son aislados a partir de sangre periférica humana mediante fraccionamiento en gradientes de densidad de Ficoll-Paque -d: 1.077 g/ml-. PMNs fueron inmunomarcados mediante un método de inmuno oro-coloidal indirecto. Como primer anticuerpo, utilizamos el anticuerpo monoclonal (AcMo) murino GRM1 (CD16) que reconoce un epítipo de la molécula CD16 (FcRIII). Como segundo anticuerpo utilizamos una inmunoglobulina IgG anti-ratón marcada con partículas de oro-coloidal de 40 nm (Auroprobe EMGAMIGG G40).

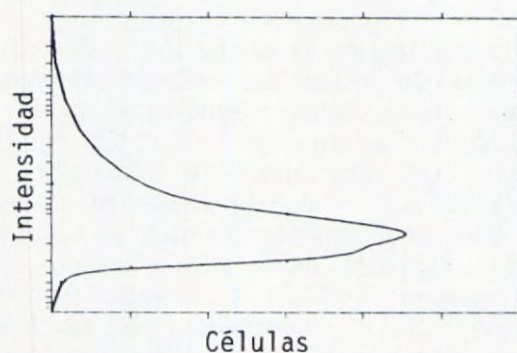
Resultados y Discusión:

En el presente estudio analizamos la expresión y distribución de la molécula CD16 sobre la superficie de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos. Las células PMN CD16⁺ son visualizadas mediante el modo BEI del microscopio electrónico de barrido. La evaluación cuantitativa, tras la fijación con glutaraldehído, muestra un alto nivel de expresión del receptor FcRIII ($x=228.70 \pm 77.30$) sobre la superficie de PMNs humanos (Fig. 1). Estudios previos, por el contrario, han demostrado que las células NK CD16⁺ humanas muestran un nivel de expresión moderado/intermedio de la molécula CD16 (FcRIII) (2, 4). Las células PMN CD16⁺ cuando son observadas mediante electrones secundarios (SEI) muestran una morfología de superficie caracterizada por marcadores morfológicos tipo cresta y escasos microvillis. Diferentes estudios mediante microscopía electrónica de barrido han

correlacionado dicho fenotipo morfológico con elementos maduros de la serie granulocítica (5). La combinación de imágenes BEI y SEI ha puesto de manifiesto en nuestro estudio que el receptor FcRIII se distribuye preferencialmente sobre las crestas. Estos indicios sugieren la existencia de dominios específicos para el receptor FcRIII sobre la superficie de PMNs humanos.

Bibliografía:

- 1)Huizinga TWJ, Dolman KM, Van der Linden NJM, Kleijer, M, Nuijens JH, von dem Borne AEG, Roos D. J Immunol 1990, 144:1432.
- 2)Anderson CL, Shen L, Eicher DM, Wewers MD, Gill JK. J Exp Med 1990, 171:1333
- 3)Petty HR, Francis JW, Anderson CL. J Cell Physiol 1989, 141:598.
- 4)Fernández-Segura, Garcia JM, Gutierrez, A. Campos A. Proceedings XIIth International Congress for Electron Microscopy. Adv Biol Sci 1990, 3:866.
- 5)Allen TD, Dexter TM. Differentiation 1982, 21:86.



1

STUDIO COMPARADO CON MEB EN LA TALASEMIA MAJOR Y MINOR

Sanchez Arcos, E.*; García López, JM., Sánchez-Quevedo, MC., López Escámez A., Campos Muñoz, A.

Servicio de Hematología. Ciudad Sanitaria Virgen de las Nieves. Granada
Departamento de Histología y Biología Celular. Facultad de Medicina.
Universidad de Granada. 18071 Granada.

Introducción: La microscopía electrónica de barrido (MEB) aplicada al estudio de la biopatología de las células sanguíneas ha contribuido a sistematizar con un mejor grado de exactitud la información relativa a los tipos morfológicos reportados por la microscopía óptica (1, 2). En relación con los tipos eritrocíticos existe además la posibilidad de correlacionar dichos datos con el estado funcional de los glóbulos rojos (3). En la presente comunicación realizamos un estudio comparado con MEB de los elementos eritrocíticos en la talasemia mayor (TM) y menor (Tm).

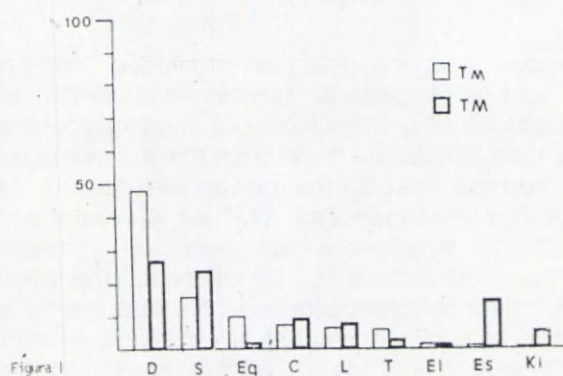
Material y Métodos: Sangre procedente de enfermos diagnosticados de talasemia mayor y menor se fija en suspensión con glutaraldehído al 2.5% en tampón fosfato. Se deposita una gota de sangre sobre un cubreobjetos recubierto con poli-L-lisina, se deshidrata en acetonas crecientes, se deseca con punto crítico y finalmente se montan y metalizan con oro. La observación fue realizada en un microscopio electrónico de barrido Philips SEM 505 a 20 kV, a una inclinación de 15° y un tamaño de spot de 50 nm. Durante la observación se realiza la tipificación morfológica y morfométrica de 100 eritrocitos.

Resultados y Discusión: Los resultados permiten comprobar variaciones significativas entre ambos procesos fundamentalmente en discoцитos (D), estomatocitos (S), codocitos (C), torocitos (T) y esquizocitos (Es) como queda reflejado en la figura 1 en la cual se muestran los porcentajes de los elementos más significativos. Nuestros resultados ponen de relieve en primer lugar la presencia de esquizocitos y kinezocitos (Ki) en elevado porcentaje en la TM respecto a la Tm. Dicha presencia así como el incremento relativo de estomatocitos, codocitos y leptocitos (L) se correlaciona con la disminución de discocitos en la TM. El patrón microscópico con MEB permite comprobar como en la TM se incrementa la transformación discocítica-estomatocítica respecto a la Tm y de los valores control (4, 5). Dicha transformación ha sido puesta

de relieve en distintas situaciones patológicas (4, 5, 6, 7) y parece estar relacionada con modificaciones significativas a nivel de la monocapa interna de la membrana eritrocítica (8). El elevado porcentaje de esquizocitos debe relacionarse con el índice de hemólisis presente en este tipo de pacientes.

Bibliografía:

- 1) Bessis, M. *Nouv. Rev. Fran. Hematol.*, 12:721-746, 1972.
- 2) Bessis, M., Weed, R.I. *Scan. Electron Microsc.*, 1978/II:290-296, 1978.
- 3) Dardano J.R., Kimzey, S.L. *Scan. Electron Microsc.*, 1979/III:809-814, 1979
- 4) Macías, F. et al. *Histol Med.*, 2:27-32, 1986.
- 5) Michan, A.L. et al. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 253:325-331, 1988.
- 6) García, J.M. et al. *Histol. Med.*, 2:17-22, 1986.
- 7) Michan, A.L. et al. *J. Int. Med*, 228 (S733):46, 1990.
- 8) Beck, J.J. *J. Theor. Biol.*, 75:487-501, 1978.



CITOLOGIA PERITONEAL EN PATOLOGIA GINECOLOGICA (M. Optico y M. Scanning)

F. Sánchez Garrido, J. Botella Llusíá, E. Aguilera Cortés,
L. M. Gómez Ariza.

Cátedra de Ginecología y Obstetricia.

Hospital Clínico. Facultad de Medicina. Universidad de Málaga.

Introducción:

Hemos estudiado por microcopía óptica y microscopía de scanning (MEB) el exudado peritoneal localizado en el fondo de saco de Douglas, observando correlación entre las características de las células obtenidas y la patología ginecológica presente.

Material y Métodos: Aprovechando laparotomías ginecológicas realizamos un aspirado del líquido peritoneal. Se le añade heparina al 1% para evitar su coagulación y lo centrifugamos 15 min. a 2000 r.p.m. El sedimento se extiende en un porta, se fija con alcohol y se tiñe según la modificación de Montalvo a la técnica de Papanicolau para el estudio por M. Optico, por el contrario, la muestra a estudiar por MEB se fija con glutaraldehído, pasa por tampón y diversos alcoholes de gradación creciente, se lleva a punto crítico y se metaliza con oro.

Resultados y Discusión:

Las características de las células encontradas en el líquido peritoneal se corresponden con la patología ginecológica.

Es interesante señalar el hecho de que en tumores malignos de ovario, aparentemente íntegros, se demuestra la presencia de grupos celulares vitales y con características malignas. La Microscopía de Scanning ofrece nuevos detalles en los fenómenos de superficie de éstas células tumorales.

Bibliografía:

1. JIMENEZ AYALA, M. y cols. Citopatología Ginecológica. Edit. Científico-Médica, 2ª Ed.: (467 y ss.). Barcelona, 1985.
2. BERCIVICI, B. y GALLILLI, R. The Citology of Human Peritoneal Fluid. Acta Cytol. 22 (124-7). 1978.
3. MAC GOWAN, L; BUNNAG, B. Morphology of Mesothelial Cells in Peritoneal Fluid of Normal Woman. Acta Cytol. 18 (205-9). 1974.
4. KONINCKX, PR; RANAERM y BROSENS, LA. Origin Of The Peritoneal Fluid in Woman: An Ovarian Exudation Product. Brit. J. Obstet. Gynaecol. 87 (177-182). 1980.
5. PORTER-BONEVILLE, J. Fine Structure of Cells And Tissues. Ed. Lea and Febiger. Philadelphia, 1983.
6. HAFEZ, E.S.E. y cols. Scanning Electron Microscopy of Human Reproductive Physiology. Act Gyn Scand Supp 40 , 1975.
7. HAFEZ, E.S.E. Atlas of Mammalian Reproduction. Ed. George Thieme. Stuttgart, 1978.

PRIMERA APARICION DE MIOFILAMENTOS GRUESOS EN LOS MIOBLASTOS DE EMBRION DE POLLO.

Toledo Lobo, M.V., Martínez Alonso, F.J.,
Martínez Cuadrado, G. y González Santander, R.

"Ciencias Morfológicas y Cirugía". Cátedra de Histología.
Facultad de Medicina. Universidad de Alcalá de Henares.

Introducción: La síntesis de las moléculas de miosina y la aparición de los primeros filamentos gruesos ha sido objeto de numerosas investigaciones. Según los estudios "in vitro", la miosina es sintetizada en los miotubos, después de la fusión de los mioblastos (DEVLIN and PERSON, 1979). Sin embargo, los estudios "in vivo" demuestran la existencia de filamentos gruesos en los mioblastos antes de su fusión (TOMANEK, 1977). Por otro lado, si bien para algunos autores los primeros miofilamentos finos y gruesos aparecen simultáneamente (PRZYBYLSKI, 1966), otros opinan que aparecen antes los filamentos finos que los gruesos (HUDGSON, 1970). El objeto de aclarar estas y otras cuestiones, hemos estudiado al microscopio electrónico de transmisión los mioblastos que integran el miotomo braquial del embrión de pollo de los estadios 17 al 20 de HAMBURGER y HAMILTON (1951).

Material y Métodos:

Varias series de embriones de pollo de los estadios 17 al 20 de HAMBURGER y HAMILTON se extrajeron en líquido Ringer y se fijaron en glutaraldehído al 3% durante tres horas. Se diseccionaron piezas que comprendían: el tubo neural, la notocorda y los somitos braquiales. Estas piezas fueron estofijadas en ácido ósmico al 1% durante hora y media. Teñidas con acetato de uranilo al 2%, se incluyeron en araldita (GONZALEZ SANTANDER, 1969). Se hicieron cortes semifinos que se tiñeron con azul de toluidina, cortes ultrafinos que fueron teñidos con citrato de plomo y observados al microscopio electrónico de transmisión.

Resultados y Discusión: Según nuestras observaciones, la primera aparición de los miofilamentos gruesos, que se produce en el estadio 18 de HAMBURGER y HAMILTON, presenta marcadas diferencias con respecto a la aparición de los primeros miofilamentos finos, que se produce en estadios anteriores. Cuando ya existe una notable cantidad de miofilamentos finos, se observan los primeros miofilamentos gruesos, muy electrodensos, los cuales, conforme aparecen, se van agrupando perfectamente ordenados en paralelo, integrando pequeños acúmulos. No hemos encontrado filamentos gruesos libres en el citoplasma. Dichos acúmulos se localizan en la periferia celular próximos al sarcolema, en áreas densas del citoplasma, con abundantes ribosomas y polirribosomas, mientras que los miofilamentos finos aparecen en áreas claras dispersas por el citoplasma. Estas áreas contienen escasas ribosomas en contraste con el citoplasma circundante, que los posee en abundancia, y en su interior los miofilamentos finos se disponen al

Hemos encontrado grandes polirribosomas de morfología helicoidal, en relación de proximidad con los acúmulos de miofilamentos gruesos. Algunos autores relacionan estos polirribosomas

con la síntesis de las cadenas pesadas de las moléculas de miosina (NATHANSON,1989).

Si bien en un principio no se observa relación alguna entre ambos tipos de miofilamentos si se relacionan en un lapso breve de tiempo, a medida que los miofilamentos gruesos que integran los acúmulos aumentan en número y longitud. Hemos encontrado grupos de miofilamentos gruesos integrados por un pequeño número de filamentos entre los cuales no se observan miofilamentos finos, y otros acúmulos formados por filamentos gruesos mas numerosos y de mayor longitud entre los cuales comienzan a observarse algunos filamentos finos, que penetran por los extremos de los paquetes de miofilamentos gruesos a través de los espacios libres existentes entre estos últimos. La distancia media entre los filamentos gruesos en el seno de estos acúmulos 19-22 nm, es aproximadamente la mitad de la que presenta en la sarcómera del adulto, 42-45 nm.

Los primeros filamentos gruesos presentan un diametro medio de 13.6 nm, similar al que presentan dichos miofilamentos en el músculo esquelético del adulto (HUXLEY,1963). Sin embargo la longitud que presentan en las imágenes obtenidas es muy variable, encontrando incluso miofilamentos de longitud inferior a los 150-160 nm que presenta la molécula de miosina. La interpretación de estos datos está siendo objeto de investigación en nuestro departamento.

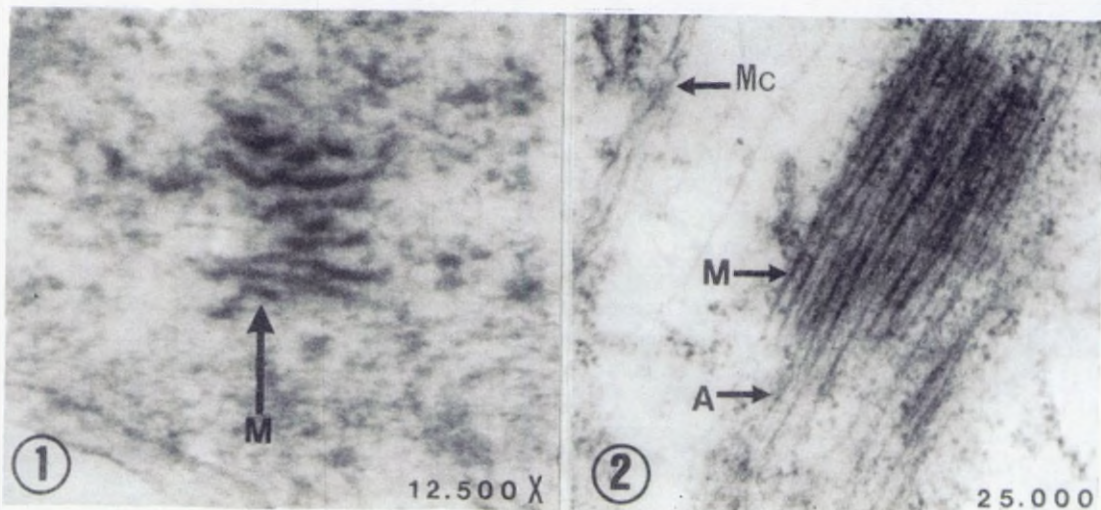
En base a nuestras observaciones, se plantea como hipótesis la posibilidad de que estos primeros acúmulos de miofilamentos gruesos sean el esqueleto sobre el cual se interdigian los miofilamentos finos para formar el esbozo de la sarcómera.

Bibliografía: HUXLEY, H.E.; J. Mol. Biol. 7:281-308 (1963). PRZYBYLSKI, R.J. et al; Lab. Invest. 11: 836-862 (1966). GONZALEZ SANTANDER, R. (ed) Aguilar Madrid (1969). TOMANEK, R.J. et al; Am. J. An. 149:227-246 (1977). Devlin, R.B. and EMERSON C. P.; Dev. Biol. 69:202-216 (1979). NATHANSON M. Intern. Rev. Citol. 116:89-164 (1989).

Fig. 1 Mioblasto. Primeros miofilamentos gruesos.

Fig. 2 Mioblasto. Miofilamentos finos interdigitados entre los miofilamentos gruesos.

A Miofilamentos finos.. **M** Miofilamentos gruesos. **Mc** Membrana citoplasmatica.



VESICULAS DE CONTENIDO ELECTRODENSO EN LOS MIOBLASTOS DEL MIOTOMO DE EMBRION DE POLLO.

Toledo Lobo, M.V., Martínez Alonso, F.J.
Martínez Cuadrado, G. y González Santander, R.

"Ciencias Morfológicas y Cirugía". Cátedra de Histología.
Facultad de Medicina. Universidad de Alcalá de Henares.

Introducción:

El metabolismo de las células precursoras del músculo estriado, mioblastos y miocardiocitos, permanece desconocido en su mayor parte. Las más recientes investigaciones están demostrando en los miocardiocitos una función endocrina que podría influir en la maduración de los mecanismos reguladores cardiovasculares. Esta función endocrina del corazón embrionario de mamíferos se verifica mediante la síntesis, almacenamiento en vesículas específicas y secreción de péptido natriurético (BOLD, 1981; CATIN y GENEST, 1985). Teniendo como precedente la demostrada función secretora y endocrina del músculo cardíaco embrionario, el descubrimiento de un nuevo tipo de vesícula, de especiales características, en los mioblastos del miotomo braquial del embrión de pollo, nos mueve a estudiar estas células bajo una nueva perspectiva.

Material y Métodos:

Varias series de embriones de pollo de los estadios 17 al 20 de HAMBURGER Y HAMILTON se extrajeron en líquido Ringer y se fijaron en glutaraldehído al 3% durante tres horas. Se diseccionaron piezas que comprendían: el tubo neural, la notocorda y los somitos braquiales. Estas piezas fueron postfijadas en ácido ósmico al 1% durante hora y media. Teñidas con acetato de uranilo al 2%, se incluyeron en araldita (GONZÁLEZ SANTANDER, 1969). Se hicieron cortes semifinos que se tiñeron con azul de toluidina, cortes ultrafinos que fueron teñidos con citrato de plomo y observados al microscopio electrónico de transmisión.

Resultados y Discusión: En los embriones de pollo de los estadios 17 al 20 de HAMBURGER Y HAMILTON estudiados, el miotomo braquial está formado por una lámina celular clara de tres a cinco mioblastos de espesor, agrupados en forma de empalizada. Dispersas en el sarcoplasma de estos mioblastos, hemos encontrado "vesículas" caracterizadas por presentar un contenido electrodenso, ligeramente separado de la membrana que lo rodea. Esta separación del contenido osmiofílico respecto a la membrana de la vesícula deja un halo claro entre ambas estructuras. Dichas vesículas presentan una forma redondeada u ovalada, con un tamaño que oscila entre 0.08 y 0.2 μ m de diámetro. El contenido electrodenso de las vesículas parece homogéneo a bajos aumentos. Sin embargo a grandes aumentos su contenido está formado por gránulos osmiofílicos inmersos en un área densa. Estas vesículas se encuentran con cierta frecuencia próximas al retículo endoplasmático rugoso. Por otro lado, hemos encontrado en el interior del R.E.R. algunas estructuras electrodensas que recuerdan el contenido de las vesículas, y hemos observado como estas vesículas parecen desprenderse de las membranas del R.E.R.

También se localizan frecuentemente cerca del sarcolema y, en algunos casos, íntimamente asociadas a la membrana plasmática, lo cual sugiere que el material que contienen las vesículas puede sufrir posteriormente su exocitosis al espacio intercelular, aunque esto no ha sido observado claramente. Se plantea como hipótesis la posibilidad de que el contenido de estas vesículas se sintetice y acumule en el R.E.R., del cual se desprendería más tarde en vesículas ya formadas, para su posterior exocitosis.

Por su tamaño y morfología las vesículas podrían ser similares a las descritas en otras células, como las observadas en miocardiocitos, que contienen péptido natriurético (VENANCE and PANG, 1989), aunque estas últimas se describen en relación con la cara de maduración del Golgi mientras que en los mioblastos nosotros no hemos podido confirmar esta relación. También podrían ser similares a las vesículas de catecolaminas de la médula adrenal (GONZALEZ SANTANDER 1965). Las vesículas descritas en mioblastos por otros autores (WALKER, 1975; TOMANEK, 1977) y que están implicadas en funciones relacionadas con la maduración del tejido muscular, tales como la formación del retículo sarcoplásmico, son morfológicamente distintas a las descritas por nuestro grupo.

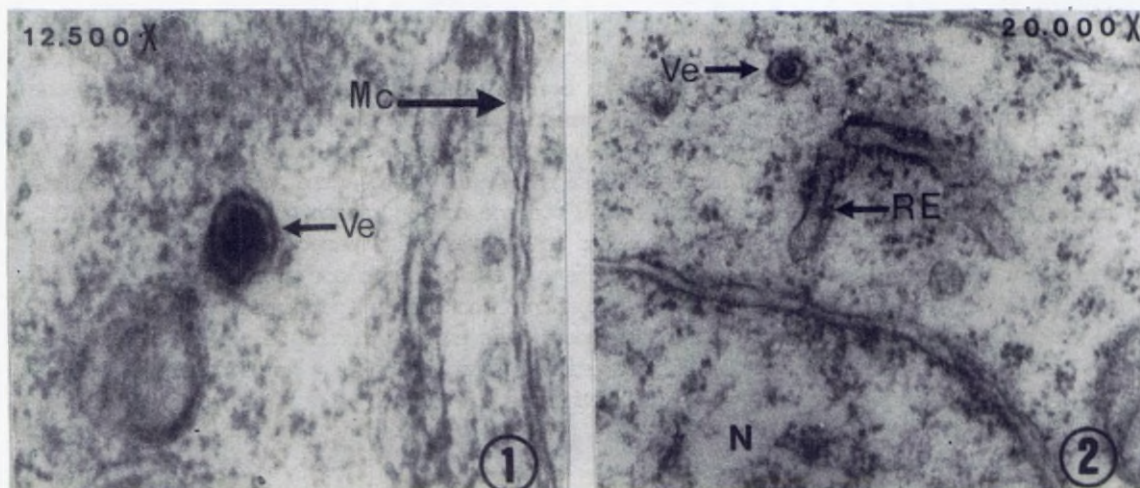
Considerando la demostrada función secretora del músculo cardíaco embrionario, el hallazgo de vesículas de especiales características en los mioblastos del miotomo, induce a pensar que estas células podrían, al igual que los miocardiocitos, no solo tener la función de maduración del tejido muscular estriado, sino también una función secretora no descrita hasta el momento.

Bibliografía: GONZALEZ SANTANDER, R.; Trab. Inst. Cajal T. LVII: 281-301 (1965). GONZALEZ SANTANDER, R.; (ed.) Aguilar. Madrid. (1969). WALKER, S.M.; J. Morph. 147: 459-474 (1975). TOMANEK, R.J. et al. Am. J. Anat. 149: 227-246 (1977). BOLD, A.J.; Life. Sci. 28: 89-64 (1981). CANTIN M. and GENEST Endocr. Rev. 6: 107-127 (1985). VENANCE, S.L. and PANG, S.C.; Histol. Histopath. 4: 325-333 (1989).

Fig. 1 Mioblasto. Vesícula de contenido electrodenso.

Fig. 2 Mioblasto. Vesícula próxima al retículo endoplásmico rugoso.

Ve Vesícula **.RE** Retículo endoplásmico rugoso **.N** Núcleo **.Mc** Membrana citoplasmática.



TRASTORNO OCUPACIONAL INDUCIDO POR LA INHALACION DE COBALTO. ESTUDIO DEL FLUIDO DEL LAVADO BRONCOALVEOLAR (BAL)

J.M.Tura¹, C.Xaus¹, A.Xaubet², A.Traveria¹, M.D.de
Castellar¹, J.Sauló¹, C.Picado², C.Agustí².

¹Lab.Tèc.Fís.Anàl., ITQT, CSIC. J.Girona Salgado, 18.
08034-Barcelona. ²Serv.Pneumologia, Hosp.Clínic.
Barcelona.

Introducción. La exposición de trabajadores al polvo producido durante el proceso de afilado de herramientas de metal duro, con muelas de corindón, provoca un trastorno pulmonar intersticial. La inhalación de partículas de cobalto metálico se ha demostrado que es tóxica. La utilización conjunta de técnicas de lavado broncoalveolar (BAL) y técnicas físicas de microanálisis tales como XPS/ESCA o SEM/EDX permiten establecer un diagnóstico seguro incluso a nivel de cantidades muy pequeñas de partículas metálicas. Se estudia un caso clínico de inhalación de partículas de Co metálico.

Material y métodos. Paciente que trabaja en industria de afilado de metales duros con muelas de corindón, afectado de tos y expectoración. El microscopio óptico revela en la biopsia transbronquial pequeños acúmulos de pigmentos oscuros. Con el líquido del BAL, previa digestión para eliminar restos celulares, se practica la determinación de metales mediante la técnica XPS/ESCA o espectroscopía de fotoelectrones excitados por rayos x. Asimismo se aplica la misma analítica a una porción de herramienta del metal duro de cobalto y tungsteno, y a la muela de corindón. Se analiza también una porción de la biopsia transbronquial con SEM y EDX.

Resultados y discusión. El diagrama ESCA correspondiente a la muela de corindón (Al_2O_3) indica la presencia de Al (Fig.1A). El diagrama correspondiente a la pieza de metal duro de las que afilaba el paciente (Fig.1B) muestra claramente los picos fotoelectrónicos principales del Co y del W, así como las transiciones Auger LMM del Co. El diagrama correspondiente al líquido procedente del BAL (Fig.1C) presenta los picos principales del Co ($Co\ p_{3/2, 1/2}$) así como la transición Auger de este elemento; en la zona espectral de baja energía de enlace puede apreciarse el pico del tungsteno ($W\ d_{5/2}$) además del pico correspondiente a Al; se observan también los elementos habituales de los tejidos humanos tales como N, O, C, P, Na, Mg, Ca y Si. La biopsia transbronquial se examinó con SEM y EDX, no pudiéndose confirmar la presencia de Co en el corte analizado, ni tampoco

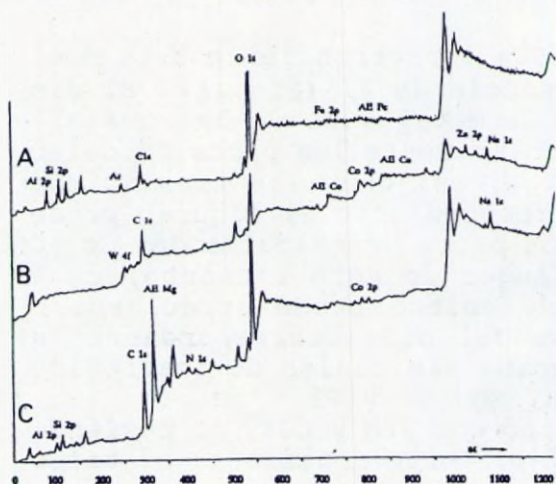
co lograron observarse los acúmulos de pigmento oscuro previamente detectados en los cortes de microscopía óptica (Fig.2). De los elementos químicos determinados por análisis XPS/ESCA en la extracción BAL, debe prestarse atención al Co y al W que, evidentemente, no pueden provenir más que del polvo aspirado procedente de las herramientas de metal duro afiladas ya que son los elementos constitutivos de este material.

En principio puede parecer paradójico que la intensidad del pico del Co sea del mismo orden que la del W, teniendo en cuenta que en la composición original la concentración del tungsteno es del orden de seis veces superior a la del cobalto. Debe de considerarse que el Co ejerce de ligando y por consiguiente su tendencia es situarse en la superficie, constituyendo un verdadero recubrimiento.

Los resultados de ESCA del líquido BAL han permitido establecer un buen diagnóstico y han evitado el practicar una biopsia pulmonar abierta. Al paciente se le recomendó únicamente trabajar protegido con una mascarilla y, pasados cuatro meses, dicho individuo se había recuperado.

Bibliografía

- P.Dumortier, P.de Vuyst et al. "Non-fibrous inorganic particles in human bronchoalveolar lavage fluids". Scan. Microsc. (1989) Vol.3, Núm.4: 1207-18.
- K.M.Nugent, R.F.Dodson et al. "The utility of bronchoalveolar lavage and transbronchial lung biopsy combined with energy dispersive x-ray analysis in the diagnosis of silicosis". Am. Rev. Dis. (1989) 140: 1438-41.
- M.R.Cullen. "Respiratory diseases from hard metal exposure. A continuing enigma". Chest (1984) 86: 513-14.



ESTIMACION DE PARAMETROS ESTEREOLOGICOS EN LOS SIMBIOTES DE DOS LIQUENES PERTENECIENTES A LA FAMILIA *UMBILICARIACEAE*.

F. VALLADARES & C. ASCASO.

Centro de Ciencias Medioambientales. C.S.I.C. Serrano 115 bis 28006-Madrid.

Introducción: El estudio ultraestructural de los simbioses líquénicos ha sido tradicionalmente abordado desde un punto de vista descriptivo y cualitativo (1, 2). La cuantificación de orgánulos y estructuras celulares en líquenes se enfrenta, en la actualidad, no sólo con una escasez de estudios preliminares que permitan acotar la variabilidad de ciertos parámetros estereológicos (como las densidades de volumen, V_v , y de superficie, S_v), sino también con la necesidad de poner a punto el método de muestreo y medida (3). En el presente trabajo se discuten algunos sesgos que pueden introducir dos métodos distintos de muestreo y se aporta información cuantitativa sobre la ultraestructura del micobionte y del fotobionte de dos líquenes pertenecientes a la familia *Umbilicariaceae*.

Material y Métodos:

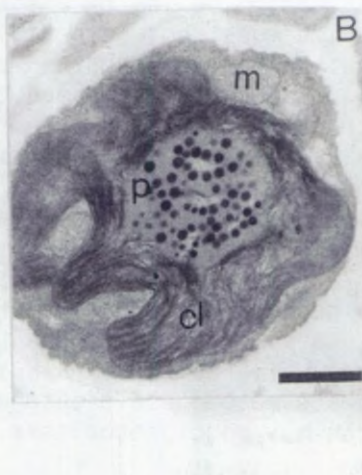
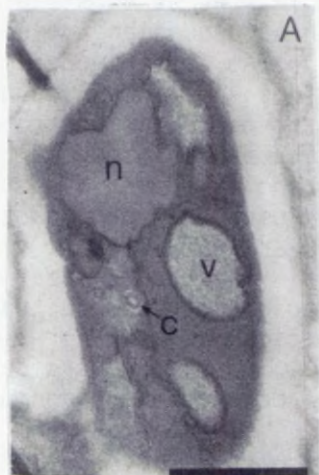
Cuatro talos de cada uno de los líquenes seleccionados para el presente estudio, *Lasallia hispanica* (Frey) Sancho & Crespo y *Umbilicaria spodochoa* var. *carpetana* prov., fueron recolectados y procesados para microscopía electrónica de transmisión (3). Se realizaron 60 fotografías de la capa algal de cada talo mediante muestreo sistemático por campos. A partir de las fotografías obtenidas se calcularon las densidades de volumen (V_v) y de superficie (S_v) del protoplasma respecto a la célula total y de los orgánulos intracelulares respecto al protoplasma, tanto para el fotobionte como para el micobionte de la capa algal.

Resultados y Discusión: La estimación de los parámetros V_v y S_v es sensible al método de muestreo, especialmente cuando las células son irregulares y se hallan dispuestas en capas heterogéneas y anisotrópicas como en el caso de los pseudotejidos de los líquenes heterómeros. El muestreo sistemático de campos fotográficos dentro de estas capas asegura una representación estadísticamente insesgada de todos los tipos y tamaños celulares, pero si debido al tamaño de estos campos un porcentaje considerable de las células resultan seccionadas, se obtiene una subestimación de los valores de $S_{v\text{protoplasma,célula}}$ y de $S_{v\text{cloroplasto,protoplasma}}$. Por el contrario, el muestreo al azar de células completas, que no conlleva una subestimación de los citados parámetros, presenta una importante sobrestimación de los valores de $V_{v\text{protoplasma,célula}}$ y de $V_{v\text{cloroplasto,protoplasma}}$, debida a la escasa representación que con este método suele obtenerse de secciones pequeñas o casquetes celulares con muy poco protoplasma.

Los resultados obtenidos indican que los valores de Vv de ciertas estructuras y orgánulos podrían ser característicos para los simbiontes de cada uno de los líquenes estudiados. En el fotobionte hemos encontrado importantes diferencias interespecíficas en las densidades de volumen de cuatro estructuras celulares: 1, Vvestroma+tilacoides,protoplasma, mayor en *U.s.carpetana* (80%) que en *L.hispanica* (63%); 2, Vvpirenoide,cloroplasto, mayor en *L.hispanica* (12.5%) que en *U.s.carpetana* (6.9%); 3, Vvmitocondria,protoplasma, mayor en *L.hispanica* con un valor medio (3.5%) casi dos veces superior al de *U.s.carpetana*; 4, Vvnucleo,protoplasma, también mayor en *L.hispanica* (4.2% frente a 0.7%). Asimismo, parecen existir tendencias propias para cada una de las especies en tres estructuras celulares del micobionte: 1, Vvvacuolas,protoplasma, mayor en *L.hispanica* (31.1% frente a 17.1%); 2, Vvlipidos,protoplasma, mayor en *U.s.carpetana* (4.6% frente a 2.5%); 3, Vvcuerpos concéntricos,protoplasma, mayor en *U.s.carpetana* (2.3% frente a 1.6%). Sin embargo, la Vvprotoplasma,célula presenta valores similares entre los fotobiontes de ambas especies y lo mismo sucede para los valores de Vvprotoplasma,célula y de Vvmitocondria,protoplasma de los respectivos micobiontes. Los cuerpos de reserva lipídicos de ambos simbiontes y el almidón del fotobionte presentan grandes variaciones inter e intratalinas, si bien en los tres casos los mayores valores de Vv se han registrado en *U.s.carpetana*.

Bibliografía:

1. BOISSIERE, M.C. 1979. Cytologie du *Peltigera canina* (L.) Willd. en microscopie électronique: le mycobionte a l'état végétatif. *Revue de Mycologie*, 43:1-49.
2. SCOTT, M.G. & LARSON, D.W. 1984. Comparative morphology and fine structure of a group of *Umbilicaria* lichens. *Can. J. Bot.*, 62:1947-1964.
3. ASCASO, C. & VALLADARES, F. 1990. Comparative stereological study of the photobiont of *Lasallia hispanica* (Frey) Sancho & Crespo and *Umbilicaria spodochoa* var. *carpetana* prov. *Symbiosis* (en prensa).



Micrografías del micobionte (A) y del fotobionte (B) de *Lasallia hispanica*. c: cuerpos concéntricos; cl: cloroplasto; m: mitocondria; n: núcleo; p: pirenoide; v: vacuola. Barra = 1µm.

ESTUDIO DE LOS CONECTORES VITRIFICADOS DEL BACTERIOFAGO T3 MEDIANTE CRIOMICROSCOPIA ELECTRONICA

J.M. Valpuesta , Hisao Fujisawa y J.L. Carrascosa

Centro de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid.

28049. Madrid.

Introducción:

El conector del bacteriofago T3, compuesto por 12 subunidades de la proteína gp8, tiene una función importante en la morfogénesis de la cápsida viral y en la translocación del ADN del y al interior de la cápsida (1). En esta última función parece tener un papel fundamental el fragmento N- y/o el C-terminal, ya que la eliminación de esos dos fragmentos por proteólisis impide la unión del ADN al conector (2). Se ha utilizado la técnica de vitrificación en especímenes cristalinos del conector de T3 en conjunción con criomicroscopía electrónica y procesamiento digital de imágenes para detectar el posible lugar de interacción del conector con el ADN.

Material y Métodos:

La purificación y cristalización del conector T3 se ha descrito en (3). La preparación de las muestras vitrificadas se ha realizado según (4), excepto que las rejillas no tenían soporte de carbón y sí unos grandes "holey films" necesarios para enfocar bajo el sistema de mínima dosis. La digitalización y el procesamiento de imágenes se realizó según se describe en (3).

Resultados y Discusión:

La determinación de la estructura tridimensional del conector del fago T3 se ha realizado previamente con especímenes cristalinos teñidos negativamente (3,5). Sin embargo, existe la posibilidad de inducción de artefactos por parte del acetato de uranilo usado en la tinción. Es por ello que se decidió la utilización de especímenes vitrificados para confirmar o no los resultados obtenidos anteriormente. Además el hecho de obtener cristales de conectores proteolizados a los que el ADN no se une nos permite conocer, aunque sea a baja resolución, el punto de unión del ADN al conector. Esto se puede conseguir mediante un mapa diferencial de los cristales de conectores intactos frente a los proteolizados. El mismo mapa diferencial con los especímenes teñidos negativamente no es estrictamente un mapa de la diferencia de masas sino de tinción. La fig.1 representa la

proyección del conector sin proteolizar preparado mediante vitrificación. La fig.2 muestra la proyección del conector proteolizado, que no interacciona con el ADN, y la Fig.3 muestra el mapa diferencial del conector sin proteolizar frente al proteolizado. En este caso se observa que las diferencias de masa se encuentran en una zona alrededor del canal, lo cual parece lógico si se tiene en cuenta que el ADN debe atravesar el canal.

Bibliografía:

- 1.- Murialdo, H. y Becker, A. (1978) Microbiol. Rev. 42, 529-578.
- 2.- Herranz, L., Bordas, J., Towns-Andrews, E., Méndez, E., Usobiaga, P. y Carrascosa, J.L. (1990) J. Mol. Biol. 213, 263-273.
- 3.- Valpuesta, J.M., Fujisawa, H. y Carrascosa, J.L. (1990) J. Mol. Biol. (aceptado)
- 4.- Valpuesta, J.M., Henderson, R. y Frey, T.G. (1990) J. Mol. Biol. 214, 237-251.
- 5.- Donate, L.E., Herranz, L., Secilla, J.P., Carazo, J.M., Fujisawa, H. y Carrascosa, J.L. (1988) J. Mol. Biol. 201, 91-100.



figura 2

figura 3

EVOLUCION DEL CITORRETICULO EN EL BAZO DE Dicentrarchus labrax (L.). ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL.

VILLENA, M.I.; AVILES-TRIGUEROS, M.; NAVARRO, V.; QUESADA, J. y AGULLEIRO, B.

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

FACULTAD DE BIOLOGIA. UNIVERSIDAD DE MURCIA. MURCIA.

Introducción:

En escasos los trabajos sobre la histogénesis del bazo en peces teleósteos, sin embargo consideramos de interés el conocimiento de los tipos celulares que crean el microambiente específico en un órgano que, durante el desarrollo embrionario es eritropoiético y en estado adulto es típicamente linfoide.

Material y Métodos:

Los estudios se han realizado en larvas de lubina (Dicentrarchus labrax L.) de 18, 40 y 60 días después de la eclosión, procedentes del Centro Costero del Mar Menor, Murcia, y en ejemplares adultos de 15-18 meses de edad obtenidos de la Planta Experimental de Cultivos Marinos en San Pedro del Pinatar, Murcia. Las muestras fueron fijadas con glutaraldehído 4% en tampón cacodilato 0.1 M (pH 7.2-7.4) durante 5h a 4°C, postfijadas en tetraóxido de osmio al 1% e incluidas en epon. Secciones ultrafinas fueron contrastadas con acetato de uranio y citrato de plomo y examinadas en un microscopio electrónico Zeiss EM-10C.

Resultados y Discusión:

El bazo a los 18 días después de la eclosión es un pequeño órgano encapsulado y relacionado con el páncreas y el tracto digestivo (Fig.1). En esta etapa el bazo es casi exclusivamente linfocitario, adquiriendo progresivamente una mayor población linfocítica.

La cápsula del bazo embrionario está formada por una capa de células mesoteliales, una membrana basal y una capa de células reticulares limitantes (Fig.2 y 4). Las células reticulares son aplanadas con procesos citoplasmáticos que contribuyen a la formación del citoretículo. En el citoplasma aparecen grandes mitocondrias y frecuentes gotas lipídicas en los estadios más tempranos (Fig.2) y en fases posteriores se observan haces de microfilamentos (Fig.4).

El citoretículo está formado por dos tipos de células con largas y delgadas prolongaciones citoplasmáticas. El tipo I está caracterizado por contener numerosas gotas lipídicas (Fig.5) y el tipo II por la presencia de haces de microfilamentos (Fig.6). Durante la histogénesis

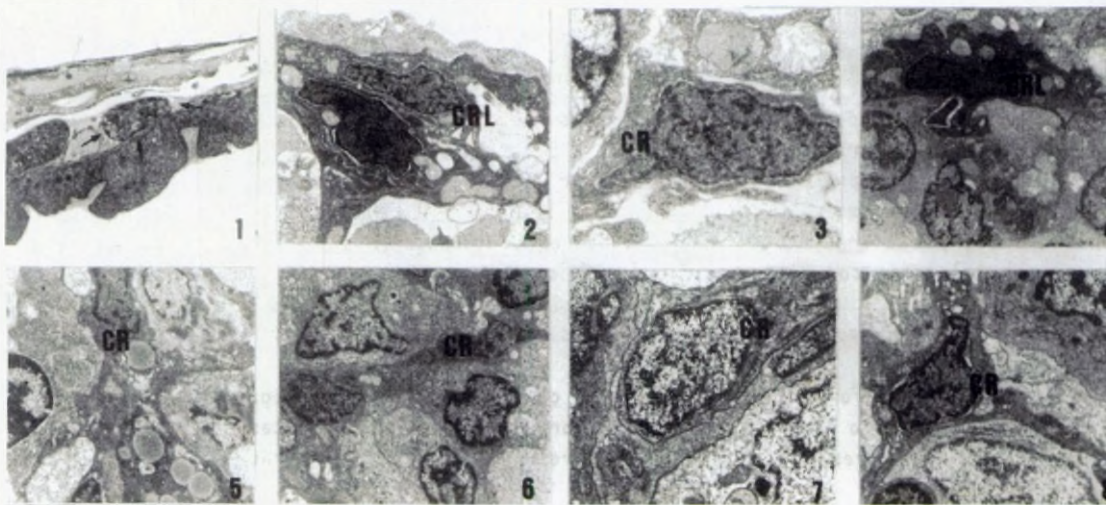
del órgano, las células tipo II se acumulan en detrimento de las de tipo I. Las células reticulares con abundantes gotas lipídicas contribuyen a la creación del microambiente hematopoiético de acuerdo con lo descrito para aves y mamíferos (Allen y Dexter, 1.976; Sorrell y Weiss, 1.980; Allen, 1.981; Quesada y cols., 1.985).

El citoretículo del bazo de ejemplares adultos está formado por células reticulares que muestran una morfología diferente según su localización, esta diferencia no ha sido descrita en otros teleósteos. Las células reticulares de la pulpa roja son claras con escasos haces de microfilamentos (Fig.7). Las células reticulares de la pulpa blanca son estrelladas con largas y delgadas prolongaciones citoplasmáticas. El citoplasma se caracteriza por ser más electronodenso de los componentes celulares del parénquima y por presentar numerosos haces de microfilamentos (Fig.8). Estas células son similares a las descritas por Fulop y McMillan (1.984) en el bazo de *Lepomis* sp como único componente celular del citoretículo.

- Fig.1. Bazo lubina 18 días después de la eclosión (↑).X100
 Fig.2. Bazo lubina 18 días después de la eclosión. Célula reticular limitante (CRL).X5000
 Fig.3. Bazo lubina 18 días después de la eclosión. Célula reticular (CR).X5000
 Fig.4. Bazo lubina 40 días después de la eclosión. Célula reticular limitante (CRL).X5000
 Fig.5. Bazo lubina 40 días después de la eclosión. Célula reticular tipo I (CR).X6600
 Fig.6. Bazo lubina 60 días después de la eclosión. Célula reticular tipo II (CR).X4300
 Fig.7. Célula reticular de la pulpa roja (CR).X6300
 Fig.8. Célula reticular de la pulpa blanca (CR).X4700

Bibliografía:

- ALLEN, T.D. 1.981. Microenvironments in haemopoietic and lymphoid differentiation. Ciba Foundation Symposium 84 ed., Pitman, London, pp. 38-67.
 ALLEN, T.D. y DEXTER, T.M. 1.976. Differentiation, 6, 191-194.
 FULOP, G.M.I. y McMILLAN, D.B. 1.984. J. Morphol. 179, 175-195.
 QUESADA, J.; AGUILLEIRO, B. y LOZANO, M.T. 1.985. J. Submicrosc. Cytol. 17 (4), 537-540.
 SORRELL, J.M. y WEISS, L. 1.980. Anat. Rec., 197, 1-19.



LOCALIZACION ULTRAESTRUCTURAL DEL ENZIMA ALCOHOLDESHIDROGENASA EN OOCITOS DE DROSOPHILA MELANOGASTER.

J. Visa, M.C. Santa-Cruz, J. Fibla*, R. González-Duarte*

Unitat de Citologia i Histologia, Departament de Biologia Cel.lular i Fisiologia, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona.
Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.

Introducción: La distribución del enzima alcoholdehidrogenasa (ADH) en Drosophila ha sido tradicionalmente analizada mediante ensayos bioquímicos e histoquímicos. Sin embargo, la obtención de anticuerpos monoclonales contra la ADH (1) nos ha permitido aplicar técnicas inmunocitoquímicas para analizar en detalle la localización tisular del enzima, tanto a nivel de microscopía óptica (MO) como electrónica (ME). En el presente trabajo se describe la distribución de la ADH en los folículos ováricos de D.melanogaster y se analiza su localización ultraestructural en oocitos maduros.

Material y Métodos: La inmunotinción a nivel de MO se realizó sobre criocortes de 4-6 μm de grosor utilizando un anticuerpo monoclonal anti-ADH (1) y un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. Los distintos tipos de plaquetas vitelinas fueron caracterizados mediante tinciones con Fast-Green y PAS.

Los estudios morfológicos a nivel ultraestructural se realizaron según técnicas convencionales (Figura 1). Para la demostración de componentes glucídicos (Figura 2) se realizó el contrastado descrito por Thiéry (2). Para inmunocitoquímica a nivel de ME se fijaron las muestras con paraformaldehído al 4 % y glutaraldehído al 0.1 % y se obtuvieron cortes ultrafinos mediante crioultramicrotomía. Se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con oro coloidal de 10 nm de diámetro (Figura 3).

Resultados y Discusión: Los resultados obtenidos a nivel de MO muestran que el enzima ADH en las primeras fases de la vitelogénesis se localiza preferentemente en las células nutritivas. En estadios más avanzados se detecta también en el ooplasma. En oocitos maduros se concentra en estructuras granulares cuyo diámetro en algunos casos supera los 20 μm . Las tinciones con Fast-Green y PAS revelan que por sus características citoquímicas dichos gránulos corresponden a plaquetas vitelinas de tipo β .

A nivel ultraestructural las plaquetas β se observan como acúmulos de glucógeno no delimitados por membrana plasmática pero rodeados por numerosas mitocondrias (Figuras 1 y 2). La aplicación de técnicas inmunocitoquímicas sobre criocortes muestra la localización mayoritaria del enzima en dichas plaquetas (Figura 3).

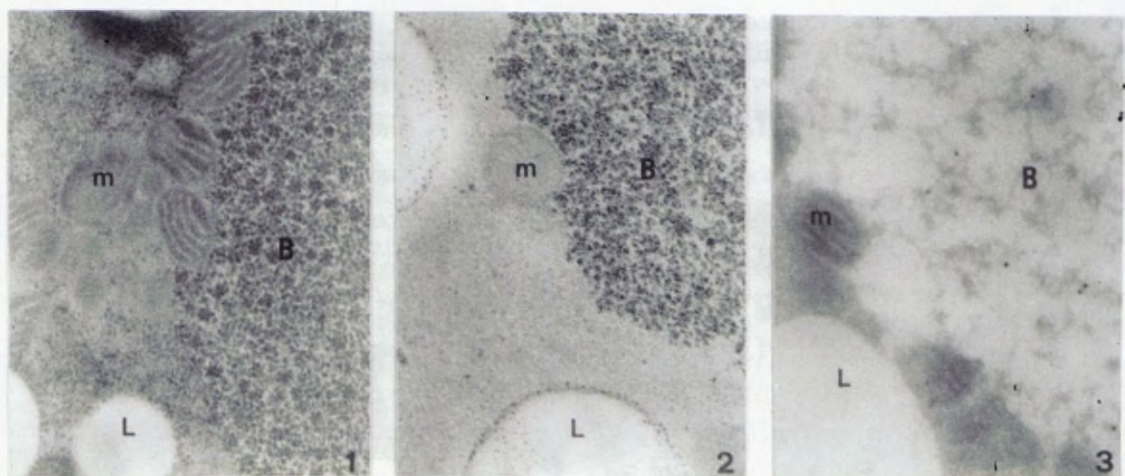
Las plaquetas β se encuentran frecuentemente asociadas a plaquetas lipídicas, sistemas membranosos y mitocondrias. Hasta el momento la relación entre estas estructuras no ha sido interpretada a nivel metabólico pero cabe destacar la proximidad observada entre las plaquetas lipídicas y las plaquetas β ricas en ADH. Las plaquetas lipídicas contienen cantidades apreciables de ecdisteroides y algunos autores han hipotetizado que la ADH en insectos podría estar implicada en el metabolismo hormonal (3). Los resultados aquí expuestos no son concluyentes al respecto pero la acumulación de ADH en la proximidad de estructuras lipídicas podría apoyar esta hipótesis.

El destino de las plaquetas vitelinas en el desarrollo embrionario es la luz del intestino y por tanto es de suponer que la ADH quedará también incluida en el tracto digestivo, donde podría tener una función detoxificante. Puesto que la síntesis zigótica de ADH no se inicia en el intestino hasta los estadios 16-17 del desarrollo embrionario (4), la ADH materna podría suplir los requerimientos de enzima en el tracto digestivo durante los primeros estadios del desarrollo.

Bibliografía

- (1) J. Fibla, L. Enjuanes, R. González-Duarte (1989) B.B.R.C. 160: 638-646.
- (2) J.P. Thiéry (1967) J. Microscopie 6: 987-1018.
- (3) J.O. Winberg, D.R. Thatcher, J.S. McKinley-McKee (1982) Biochim. Biophys. Acta 704: 7-16.
- (4) T.J. Lockett, M. Ashburner (1989) Dev. Biol. 134: 430-437.

Los estudios ultraestructurales ha sido realizados en el Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Barcelona.



B: plaquetas vitelinas tipo β . L: plaquetas vitelinas lipídicas. m: mitocondrias.

Applications of X-ray microanalysis in medicine

Alice Warley, Division of Biochemistry (Block 9) U.M.D.S. St.
Thomas's Hospital Medical School, Lambeth Palace Road, London SE1
7EH.

X-ray microanalysis is a technique which is highly suitable for the study of biological specimens. It is the only technique which combines the resolving power of the electron microscope with the ability to undertake element analysis, and offers the following advantages over other techniques: the ability to undertake the analysis of individual cells within a tissue; the ability study the subcellular distribution of elements without disrupting the cell; and the ability to study the distribution of a number of elements simultaneously. X-ray microanalysis is now well established in biology and medicine and applications can be divided into two general areas, the identification, usually of accumulated material, within cells and tissues, and the study of the diffusible cations.

An example of the use of X-ray microanalysis to determine the composition of a dense accumulation is shown in Figure 1. The material examined was a liver biopsy specimen which had been fixed and stained for routine electron microscopy. In this specimen dense material was present accumulated around the

lysosomes in the cytoplasm of the parenchymal cells. X-ray microanalysis showed that iron was associated with the dense material, and helped in the diagnosis that the patient was suffering haemochromatosis, a disorder of iron metabolism. Different areas in which X-ray microanalysis has been used for identification of accumulated material in pathological tissues include: identification of inhaled particles (e.g. asbestos and silicates in the lung); accumulations of endogenous origin in the liver (e.g. iron or copper); identification of Ca accumulation associated with disease; and analysis of renal stones. Such applications have been reviewed recently (Roomans, 1989; Shelburne, 1989). X-ray microanalysis offers an easy means of identification in such cases, since specimen preparation is simple, and the analysis can often be carried out on samples which have already been prepared for routine examination. If an accumulation is identified in a paraffin wax embedded section, the paraffin can be removed and the accumulation analysed using a scanning electron microscope. The major advantage of X-ray microanalysis for identification purposes is, no doubt, the fact that the spectrum contains peaks for all elements which are present in the analysed area. This means that there is no need to carry out sequential analyses to determine the presence (or absence) of different elements.

The second major area of application of X-ray microanalysis is the study of the diffusible cations sodium, magnesium,

potassium and calcium. The intracellular concentration of these elements is finely controlled. Fluxes of these elements across the cell membrane, or release from intracellular stores, cause stimulation in many different cell types; imbalance may lead to cell death. The study of the diffusible elements and their alteration in disease is now a major area in medical research. To study the diffusible elements using X-ray microanalysis cryofixation is required, in order to arrest the elements at their site of action in the cell. Cryofixation must be followed by other cryopreparative techniques, for example, sectioning at low temperature followed by freeze drying, to prevent redistribution of the ions of interest. Here two different applications of X-ray microanalysis in medical research will be described.

An increase in heart disease is associated with diabetes mellitus, and a number of studies have led to the suggestion that a cardiomyopathy may develop as a result of increased intracellular calcium concentrations. However, there have been no direct analyses of heart tissue from diabetics to confirm this. Heart tissue from experimental animals can be cryofixed in situ (Warley, 1989), and the sectioned tissue analysed directly to determine whether such an increase occurs. Results from these studies showed an overall increase in sodium in cardiac myocytes from diabetic animals (Warley, 1991), but no gross changes in calcium were detected. An interesting finding in this study was that cells which showed a lowered ratio of potassium to sodium

could be found close to cells containing control concentrations of elements (Warley, 1991). This suggests that localised cell death is occurring, which could account for lowered contractility of heart tissue in diabetes.

Isolated adult cardiac myocytes are often used as a model for the study of the physiology of cardiac cells. The isolated cells form two populations, the rod and round shaped cells, which are morphologically distinct at the light microscope level. The differences between these two cell types can be clearly seen in the freeze dried frozen sections (Figure 2). The rod shaped cells (Figure 2a) which are viable, have the morphology of intact heart tissue with mitochondria, nucleus and the z-lines clearly visible. Whereas the round shaped cells (Figure 2b), which are non viable, lose the characteristic morphology, become contracted, and loose mitochondria into the surrounding medium. Spectra obtained from the analysis of the two different types of cell are shown in Figures 2c and 2d. The mitochondria from the rod shaped cells have high concentrations of potassium and low concentrations of sodium and chlorine and calcium is not detected. The mitochondria from the round shaped cells have a different profile, with high concentrations of sodium and chlorine and a low concentration of potassium. Calcium is greatly increased in the mitochondria from these cells, results which agree with the idea that mitochondria accumulate calcium under conditions of intracellular overload.

The above examples illustrate the advantages of using X-ray microanalysis for the study of diffusible elements. Both examples show the benefit of being to analyse individual cells. It is clear that elemental composition can differ considerably between cells, such distinct differences are not seen if an analytical technique is used which gives only an average value for a total cell population. Indeed changes in element composition can occur at the level of subcellular organelles, and again this information is not available with other analytical methods. The fact that an X-ray microanalysis spectrum contains information about all the elements of interest is also extremely useful, enabling an 'element profile' of the individual cell to be obtained. Such a profile supplies information which allows us to gain insight into the mechanisms which underlie the onset of disease. Clearly the application of X-ray microanalysis in medicine and medical research will help our understanding both of normal cell function and of the diseased state.

Acknowledgments. The author would like to thank the Garfield Weston Foundation for financial support, and Link Analytical and Rego CIA for sponsoring my visit to this conference.

References

Roomans G.M. (1989). Electron probe microanalysis in pathology. In: Electron probe microanalysis applications in biology and

medicine. Vol 4 . Springer series in biophysics (ed K. Zierold, H.K. Hagler). Springer-Verlag, Heidelberg pp293-304.

Shelburne, J.D. Roggli, V.L. Ingram, P. and Tucker J.A. (1989) Microprobe analysis in medicine- present practice and future trends. In: Electron probe microanalysis applications in biology and medicine. Vol 4 . Springer series in biophysics (ed K. Zierold, H.K. Hagler). Springer-Verlag, Heidelberg. pp 305-316.

Warley A. (1989) Cryofixation of heart tissue for X-ray microanalysis. Scanning Microscopy 3, 1247-1252.

Warley A. (1991) Increases in sodium concentration in cardiac myocytes from diabetic rats. Scanning Microscopy 5, (in press).

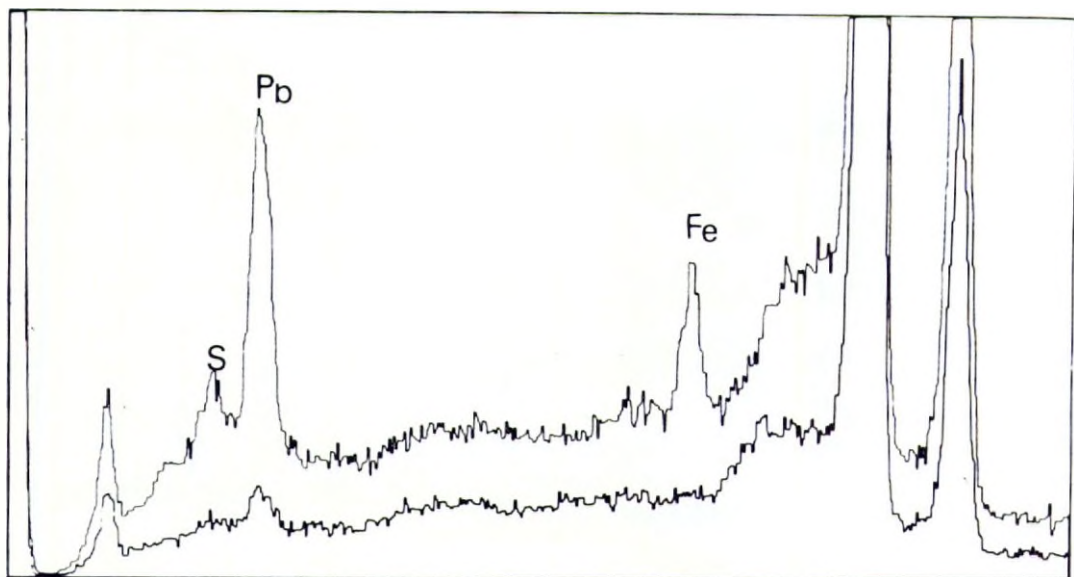


Figure 1. X-ray spectra taken from dense accumulations (upper trace) and the adjacent cytoplasm (lower trace) of a liver cell in a biopsy specimen.

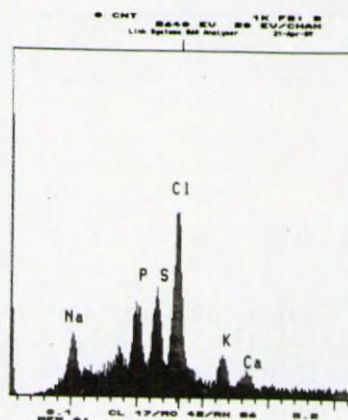
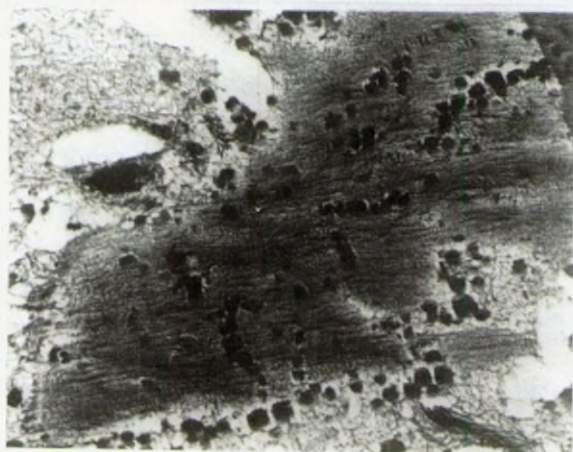
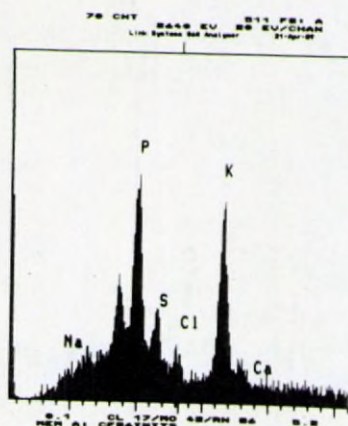


Figure 2. Freeze dried frozen sections of isolated cardiac myocytes showing (a) rod and (b) round shaped forms, and spectra from the mitochondria of (c) a rod shaped and (d) a round shaped cell.

ESTUDIO MICROANALITICO DE TEJIDO PLEURAL NO PATOLOGICO MEDIANTE SEM Y EDXA

C.Xaus¹, J.M.Tura¹, J.Ferrer², J.Lirola², R.Orriols², A.Traveria¹, J.Sauló¹

¹Lab.Tèc.Fis.Anàl., ITQT, CSIC. J.Girona,18. Barcelona. ²Serv.Pneumol.,Hosp.Vall d'Hebron. Barcelona.

Introducción. Las técnicas microanalíticas SEM y EDX han sido usadas en la detección de partículas inorgánicas en tejidos humanos. No obstante, el tejido pleural ha sido escasamente investigado. El objetivo de este estudio ha sido conocer si existía una deposición inorgánica en pleuras de sujetos no silicóticos. Se pretende establecer un patrón de normalidad en el tejido pleural humano. Para ello se determinan las intensidades de Si, normalizándolas con respecto a las de S como indicador de la masa de tejido. La relación Si/S resulta un buen indicador de patología respiratoria silicótica como ya había sido establecido por Funahashi, Siegesmund y col. para el pulmón.

Material y métodos. Se estudia el material necrópsico de once individuos no afectos de patología pleural ni antecedentes de contacto con material inorgánico, analizándose ambas pleuras parietal y visceral así como el pulmón correspondiente. Las muestras, gruesas, desecadas por punto crítico y recubiertas con carbón, son observadas al microscopio electrónico de barrido (Philips 515) y analizadas por dispersión de energía de rayos x (EDAX PV 9800). Por cada muestra se analizan cinco campos, representativos del total de ella, a 160 aumentos. La cuantificación de los elementos se realiza por el método de intensidad de pico/ background.

Resultados y discusión. Grosor de la muestra. Previamente se determinó la cantidad de azufre en función del grosor de la muestra para lo cual se analizó el S de secciones de pleura de 10, 20, 30, 40, 50 y 60 μm . Se observó que existía una buena correlación lineal entre el azufre y la masa de tejido hasta el grosor de 40 μm (coeficiente de correlación $r=0.9963$), considerándose éste como el grosor crítico infinito. Con ello los resultados son independientes del grosor de la muestra.

Criterio de normalidad. Se observa que el valor de S o masa de tejido es inferior en ambas pleuras y más elevado en pulmón, con desviaciones standard similares para los tres tipos de tejido. Asimismo se observa que el valor medio del Si es más elevado en el pulmón que en las hojas pleurales, siendo similar para ambas pleuras; también la dispersión es similar en las dos

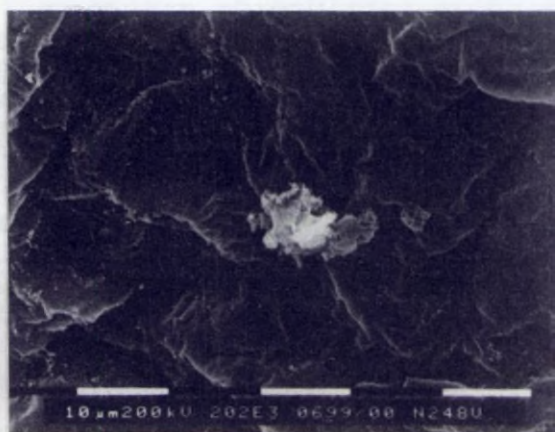
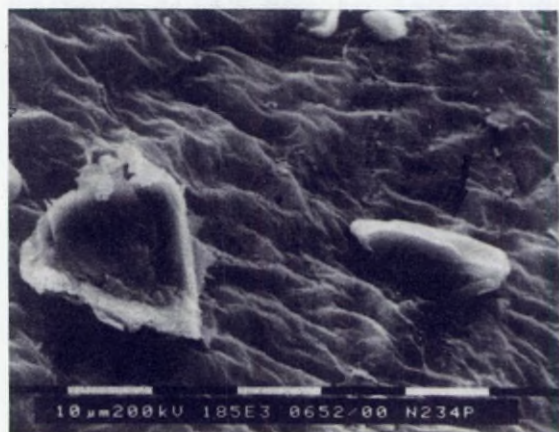
pleuras. Se determina la cantidad real de Si, es decir la relación Si/S o silicio corregido por la masa de tejido. Los resultados nos indican que la concentración de Si en pleura es superior a la de pulmón, en especial pleura parietal.

Por fin se determinan unos niveles arbitrarios de normalidad que, con un intervalo de confianza del 95%, nos muestran que el valor máximo para pulmón es de 0.15, para pleura visceral de 0.18 y para pleura parietal de 0.24. Así pues quedan establecidos los criterios para determinar la existencia o no de patología pleural. Valores superiores a los hallados serán indicativos de patología.

El hecho de haber determinado el silicio para establecer un criterio de normalidad se debe a que este elemento es el más extendido en la corteza terrestre representando por tanto un riesgo inhalatorio constante. El análisis por SEM y EDX ha permitido también observar que la pleura es una zona de depósito de material inorgánico, introducido en el organismo a través de vías respiratorias o vías linfáticas o bien transportado por macrófagos. Se ha demostrado la existencia de partículas de Si, Fe, Al (Fig.1), Cu, Co (Fig.2) o Ca en individuos sin patología respiratoria.

Bibliografía

- Funahashi,A., Pintar,K., Siegesmund,K.A. "Identificación of foreign material in lung by energy dispersive x-ray analysis". Arch.Environ.Health 30 (1975) 285-89.
- Funahashi,A., Siegesmund,K.A., Dragen, R.F., Pintar,K. "Energy dispersive x-ray analysis in the study of pneumoconiosis". Brit. J.Ind.Med. 34 (1977) 95-101.
- Brody,A.R., Vallyathan,N.V., Craighead,J.E. "Distribution and elemental analysis of inorganic particulates in pulmonary tissue". S.E.M. (1976) III 477-82.



CAMPO INORGANICO

FLUENCIA DE ALGUNOS ELEMENTOS REFRACTARIOS EN LA MICROESTRUCTURA Y FRACTURA DE ALEACIONES BASE NIQUEL PROCESADAS MEDIANTE SOLIDIFICACION RAPIDA

devea, J.L.González-Carrasco, J.Ibáñez, G.González-Doncel, M^a C.Cristina y M.Aballe*.

talurgia Física

ntro Nacional de Investigaciones Metalúrgicas.CSIC

entro de Investigación y Desarrollo del Aluminio. INESPAL

trabajo financiado por la CICYT (MAT 88-254).

roducción: El procesado de las aleaciones de base níquel mediante solidificación rápida ha permitido mejorar de forma importante, algunas de sus características mecánicas tales como la ductilidad a temperatura ambiente y la fragilidad dinámica a temperaturas elevadas. Las ventajas que introduce el proceso y que conducen a estas mejoras son: la disminución de segregaciones e impurezas en fronteras de grano; la posibilidad de aumentar la cantidad y variedad de elementos aleantes para producir reforzamiento por solución sólida y/o cohesión de las fronteras de grano que de otro modo darían lugar a la presencia de fases fragilizantes; estructuras con tamaños de grano muy finos; en el caso en que aparezcan fases ordenadas tal como la Ni_3Al , la SR disminuye el grado de orden dando lugar a una elevada proporción de dominios de antifase (APB).

aterial y Métodos: Las aleaciones están basadas en la composición $Ni_{12}Cr_{20}Al_{11.5}X$ ($X=Al=76,5/23,5$) a la que se han añadido pequeñas cantidades de Nb, Ta o Mo. Las aleaciones madre se prepararon mediante fusión y colada en horno de inducción en atmósfera controlada. A continuación se prepararon cintas mediante la técnica de la rueda, empleando discos de cuarzo, presión de He y una velocidad lineal de $47ms^{-1}$. La rueda es de acero inoxidable y de 30cm de diámetro. Las tres aleaciones, preparadas metalográficamente(1), se caracterizaron mediante MEB y Microanálisis, MET y Microanálisis, Análisis de Imagen y difracción de rayos X. Además se estudió el comportamiento mecánico a través de ensayos de tracción a temperaturas y velocidades de deformación comprendidas entre $298K < T < 773K$ y $5 \times 10^{-5} < \dot{\epsilon} < 10^{-2}$ respectivamente.

ultados y Discusión: La microestructura, similar en los tres materiales, es del tipo celular-dendrítico con granos columnares que crecen desde la cara de la rueda ocupando todo el espesor (Fig.1). En la superficie libre se observan granos y celdas de un tamaño de $8 \mu m^2$ (Fig.2). En la superficie pulida se aprecia una segunda fase situada en frontera de grano y de celda (Fig.3) presentando un mayor contenido en aluminio que la matriz. El Cr y el cuarto elemento se encuentran en solución en ambas fases. Los diagramas de difracción de la seleccionada obtenidos sobre la matriz indican que se trata de una fase f.c.c. ordenada. Asimismo se observan pequeños dominios. Mediante MET y difracción de rayos X se han identificado ambas fases: la matriz constituida por Ni_3Al y la segunda fase por $NiAl$. Se puede concluir que la solidificación ha tenido lugar con la desestabilización del frente plano desde el comienzo, solidificando dendritas de fase Ni_3Al metaestable(2). Como consecuencia, la fase pulida va enriqueciéndose en aluminio, $K_A < 1$, solidificando finalmente la fase $NiAl$ en la frontera de celda y grano.

ha evaluado la fracción de volumen de la fase $NiAl$ (Vv) mediante técnicas de Análisis de

Imagen, adquiriendo las imágenes directamente del MEB y mediante difracción de rayos se ha estimado el parámetro de orden S y el tamaño de los dominios D de la fase Ni_3Al . Los resultados se muestran en la Tabla.

Alloy	Vv,%	S	D
Ni12Cr20Al1.5Nb	17±3	0.3	17
Ni12Cr20Al1.5Ta	14±1.4	0.3	24
Ni12Cr20Al1.5Mo	10±1.6	0.3	21

Se puede concluir que las adiciones de Nb, Ta y Mo no alteran la naturaleza de las fases presentes pero si afecta a sus proporciones relativas debido a la diferente solubilidad de los aleantes en las fases. En relación con el comportamiento mecánico, las aleaciones con Nb y Ta son extremadamente frágiles a todas las temperaturas y velocidades de deformación. El material siempre rompe en la región elástica de la curva de tracción. La superficie de fractura es intercrystalina con una estructura muy direccional (Fig.4). La aleación con Mo rompe a temperatura ambiente con un alargamiento próximo al 3%. La superficie de fractura muestra cúpulas (Fig.5) y se observan bandas de deslizamiento en la región próxima a dicha superficie (Fig.6). A 773 K el material se vuelve frágil rompiendo siempre en zona elástica. La mayor ductilidad que presenta esta aleación se debe a que está relacionada con la menor Vv de fase $NiAl$, ya que esta fase es dura pero muy frágil. También ha de relacionarse con el tamaño de los APB (3). En nuestro caso, sin embargo, no parecen ser éstas las razones que podrían explicar la mayor ductilidad de la aleación con Mo ya que tanto D como S son similares en las tres aleaciones estudiadas. Se necesitan continuar estos estudios para poder explicar dicho comportamiento.

Bibliografía:

- 1.-J.L. González-Carrasco. Tesis Doctoral. (1988). U.C.M.
- 2.-P.Adeva, J.L. González-Carrasco and M. Aballe. Acta metall. mater. 38, 4 (1990) 643-653.
- 3.- A.Inoue, H.Tomioka, and T. Masumoto. Met. Trans. 14A, July(1983): 1367-1377.



Fig.1



Fig.2



Fig.3



Fig.4



Fig.5

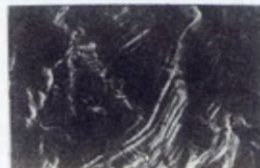


Fig.6

APLICACION DE LA MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO AL ESTUDIO DE LA DISTRIBUCION RADIAL DE INCLUSIONES EN UN ACERO INOXIDABLE TIPO AISI-303. MEDIANTE DIGITALIZACION Y ANALISIS DE IMAGENES.

JUAN F. ALMAGRO BELLO Y M^a AUXILIADORA HEREDIA LOZANO

LABORATORIO DE ACERINOX, S.A.

Introducción:

Los aceros inoxidables austeniticos resulfurados (AISI-303) se emplean por su fácil maquinabilidad y suelen presentarse como redondos para sus aplicaciones más usuales. La maquinabilidad está influenciada por la composición química y la estructura. Es fundamental el estricto control inclusionario (tamaño, forma y distribución de inclusiones).

El pequeño tamaño de algunas de las inclusiones que aparecen en este acero hace poco práctico el empleo de la microscopía óptica. Frente a esto, la mayor resolución de la M.E.B. y la Digitalización y Análisis de Imágenes por ordenador tienen ventajas evidentes para obtener resultados acerca de parámetros de interés metalúrgico como los de este estudio.

Material y Métodos: - Microscopio Metalográfico OLYMPUS PMD.

- Microscopio Electronico de Barrido HITACHI S-570 con detector de electrones retordispersados ROBINSON RBH-570R y Microanalizador KEVEX-8000 con programas de adquisición y análisis de imagen de KEVEX.

Los análisis se realizaron sobre una sección transversal al eje del redondo. La superficie se preparó puliendo mecánicamente hasta un acabado final de A1203, 1 μ m. Las áreas de análisis en las zonas exterior, intermedia y núcleo se seleccionaron según el esquema de la fig. I. Las imágenes se adquirieron a 1.500 aumentos (3.365 μ m²). En cada imagen se midió (a) Area total ocupada por inclusiones. (b) Area media ocupada por cada inclusión. (c) Diámetro medio de cada inclusión asimilandola a un círculo. (d) Número total de inclusiones en cada campo.

Resultados y Discusión:

Se estudió la distribución radial de inclusiones en tres palanquillas laminadas a redondos de \varnothing finales 7, 10 y 11,11 mm. de acero AISI-303. En primer lugar mediante Microscopía óptica se calculó el área total ocupada por inclusiones distintas de sulfuros; en los tres casos era menor de 0,01%. Este área es insignificante frente a la ocupación de sulfuros de manganeso por lo que en adelante no se diferenciará entre inclusiones. En la fig. II se representan los promedios obtenidos para cada zona: núcleo, intermedio y exterior. Los resultados obtenidos (tabla I) confirman las ideas básicas de la literatura; ya que el azufre es prácticamente insoluble en el acero, los niveles de inclusiones (SMn), a igual concentración de manganeso, en exceso, van a estar en función de la concentración de azufre en cada uno de los redondos del estudio.

Muestra	Z en peso				
Identif.	Mn	S	An	Ai	Ae
A	1.75	0.30	1.42	1.48	1.52
B	1.80	0.27	1.15	1.33	1.36
C	1.65	0.28	1.35	1.42	1.42

An = % de área total ocupada por inclusiones en la zona del núcleo.

Ai = % de área total ocupada por inclusiones en la zona intermedia.

Ae = % de área total ocupada por inclusiones en la zona exterior.

TABLA I

La distribución y dimensiones de los sulfuros en los materiales a igual composición química depende del modo de solidificación y de las posteriores transformaciones mecánicas. En nuestro caso, debido a que solo se conocen la composición química y los diámetros finales, no se puede establecer una relación entre distribución y tamaño de los sulfuros con el diámetro de la barra. No obstante, en la fig. 11 se observa que: En el núcleo, las inclusiones son más pequeñas al disminuir el tamaño del redondo. Comparando los tamaños de las inclusiones dentro de cada redondo, en los tres casos se cumple que las inclusiones en el núcleo son mayores que en el exterior. También se observa, en los tres casos, que aumenta el número de inclusiones desde el núcleo hacia el exterior.

Finalmente, la M.E.B. unida a la Digitalización y Análisis de Imágenes es una herramienta muy importante, desde el punto de vista metalúrgico, para resolver los problemas de la caracterización de los materiales, a niveles a los que no era posible acceder mediante técnicas clásicas, como en este trabajo.

Bibliografía

- J.M. Belló. VII Jornadas Metalúrgicas Hispanofrancesas. Madrid, Jun. 1976. p.25.
- A. Inchaurrea. VII Jornadas Metalúrgicas Hispanofrancesas. Madrid, Jun. 1976. p.77.
- C. Bertrand, J.M. Palacios. II Con.Nac. de Tec.Sid. Bilbao, 1989. p.83.
- C. Bertrand, J. Molinero. Novomáquina, 137, 144 (1987).
- T.J. Baker. Sulfide Inclusions in Steel. Port Chester, New York, 1974. p.135.
- D. Benait y col. La Revue de Metallurgie - CIT, 525, Jun. 1988.
- R.H. Greiss. Microanalysis Analytical Course, KEVEX, Corp., 1988.

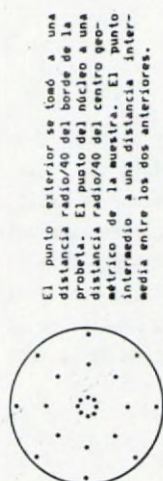


FIGURA 1. Selección de áreas.

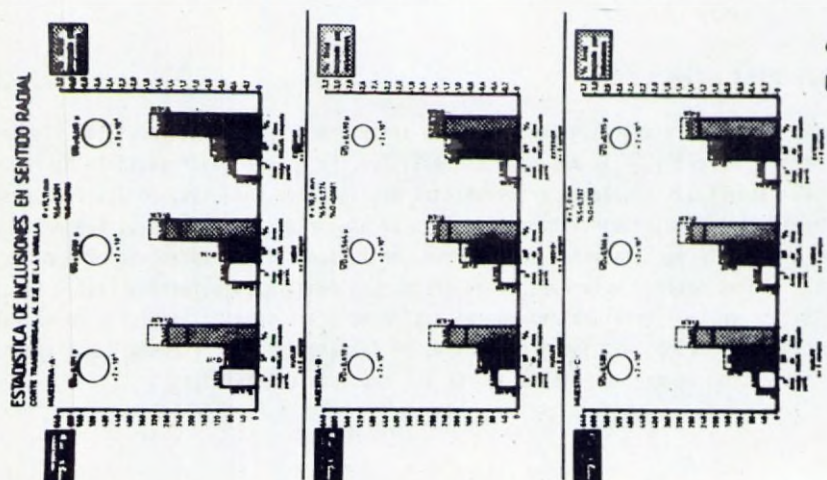


Fig.2

CONTRASTE ANOMALO EN ALEACIONES Al-Si OBSERVADO EN EL M.E.B.

J.M. Badía Pérez (1) y J. Ibañez Ulargui (2)

(1) Escuela Técnica Superior Ingenieros Aeronáuticos, Madrid

(2) Centro Nacional de Investigaciones Metalúrgicas, Madrid

Introducción: En el examen al microscopio electrónico de barrido (MEB) de muestras de aleaciones Al-Si se ponen de manifiesto ciertos fenómenos contradictorios con el comportamiento habitual de las muestras metálicas. En general, la emisión de electrones aumenta con el Z de la muestra, sobre todo en elementos ligeros. Sin embargo, en muestras recién pulidas de aleaciones Al-Si, el Si (Z=14) aparece más oscuro que el Al (Z=13) cuando examinamos la muestra en el modo de secundarios. Este fenómeno fue ya descrito por Paul y col. (1), que lo atribuyeron a diferencias de rugosidad superficial entre ambas fases.

También Ball y col.(2) hablan de un contraste anómalo en estas muestras cuando se utiliza la señal de electrones retrodispersados.

Material y Métodos:

Diversas muestras de aleaciones Al-Si han sido examinadas en el MEB, inmediatamente después de ser pulidas, así como al cabo de un tiempo de permanencia al aire.

Se ha utilizado el detector de secundarios para el estudio de la influencia de aplicar una tensión de polarización a la muestra sobre el contraste de la misma. Para examinar las muestras en el modo de retrodispersados se ha utilizado un detector de tipo semiconductor, así como el mismo detector de secundarios pero con una polarización de -200V en la rejilla.

Resultados y Discusión: El contraste anómalo entre el Si y el Al (fig.1) se ve modificado bajo determinadas condiciones. Si la muestra sufre la acción continuada del haz sobre un mismo campo, hay una progresiva disminución de la emisión, así como una inversión del contraste, apareciendo el Si más brillante que el Al. Un comportamiento análogo se aprecia en muestras que han permanecido largo tiempo al ambiente antes de ser examinadas en el MEB.

Por otro lado, la presencia de partículas de polvo no conductoras sobre la superficie de la muestra origina una variación del contraste en sus proximidades. Dado que es conocido que las partículas no conductoras, al ser excitadas por el haz, se cargan negativamente, provocando la aparición en sus proximidades de un potencial positivo sobre la muestra, este comportamiento pone de manifiesto que el contraste atípico entre las fases está relacionado con efectos de carga, y no con diferencias de rugosidad, como defendía Paul.

Para comprobar esta afirmación, se ha procedido a la aplicación de - diferentes potenciales de polarización a una muestra de aleación. Con po-
tenciales negativos o nulos (figs. 3 y 4), el contraste de la muestra no -
sufre grandes variaciones, apareciendo más oscuros los cristales de Si.

Sin embargo,, al aplicar a la muestra un potencial de +5V (fig.5) la -
emisión de electrones en las dos fases resulta similar, y para tensiones -
superiores el contraste se invierte (fig.6). Este comportamiento vuelve
a refirmar la hipótesis antes mencionada de que las anomalías de contraste
en estas muestras nada tienen que ver con su acabado superficial. La in-
versión de contraste producida con tensiones positivas de polarización po-
drían ser debidas a diferencias en los picos de emisión de secundarios del
aluminio y silicio.

Por otro lado, observaciones de las mismas muestras con la señal de re-
trodispersados con diferentes energías del haz incidente no han puesto de -
manifiesto ninguna inversión del contraste, contrariamente a lo defendido -
por Ball y col. En todos los casos, el Si aparece más brillante que el -
Al, (fig. 2), como era de esperar al tener un número atómico más elevado.

Bibliografía:

- (1) J.Paul, B. Bauer : "Contrast techniques for phase separation in scan-
ning electron microscope", Pract. Met., 20, 1983, 213-221
- (2) M.D. Ball, L. Wilson, S. Whitmarsh : "Anomalous backscattered electron
contrast", Alcan Int. Electron Micros.& Analysis, Manchester 1987
185-188



Fig.1

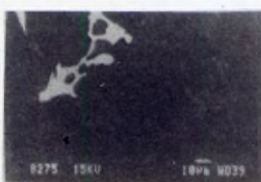


Fig.2



Fig.3 -15V



Fig.4 OV

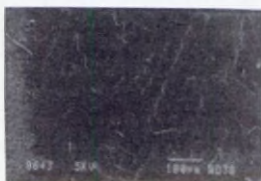


Fig.5 +5V



Fig.6 +15V

CARACTERIZACION DE MATERIALES Y DISPOSITIVOS PARA
DETECCION DE IR MEDIANTE TECNICAS DE MICROSCOPIA
ELECTRONICA

P.A. Banda y J. Sangrador
Departamento de Tecnología Electrónica y Bioingeniería
E.T.S.I. Telecomunicación. Universidad Politécnica de Madrid

roducción:

detección de infrarrojo lejano, en la ventana de transmisión atmosférica de 8 a 14 μm , tiene especial utilidad por corresponder a la emisión de cuerpos que se encuentran a una temperatura en torno a 300K. Los dispositivos para esta aplicación se realizan casi exclusivamente en telururo de cadmio y mercurio ($\text{Hg}_{1-x}\text{Cd}_x\text{Te}$). Mediante la adecuada selección del material (fracción molar de CdTe, x) se puede ajustar la longitud de onda en la que el dispositivo presenta el máximo de efectividad.

aterial y Métodos:

Utilizamos tres modos de funcionamiento del microscopio electrónico de barrido: 1/ Imagen de electrones secundarios; 2/ Análisis dispersivo de energía de rayos-X(EDS); 3/Corriente inducida por haz de electrones (EBIC). Estas técnicas se utilizan de forma rutinaria en el DTEB para la caracterización de sustratos de CMT (Telururo de cadmio y mercurio), de capas crecidas de CMT sobre CdTe mediante LPE y de diodos mesa fabricados mediante implantación iónica de B.

ultados y Discusión:

La puesta a punto de las técnicas de análisis se ha tenido en cuenta el peculiar comportamiento del material utilizado (CMT), que sublima a temperaturas de algunas decenas de grados, y de los propios dispositivos, que son sensibles a la radiación emitida por superficies que se encuentran a temperatura ambiente. Mediante la imagen de electrones secundarios se caracteriza la morfología y defectos en los crecimientos epitaxiales. La técnica de análisis EDS permite la determinación de la composición actual del material, parámetro del que depende la longitud de onda de corte de los dispositivos con el fabricados. Se realizan en el DTEB medidas de EBIC que permiten delimitar la posición de las uniones fabricadas y conocer la profundidad hasta la que se

las uniones fabricadas y conocer la profundidad hasta la que se ha producido la inversión del tipo de conductividad por efecto de la implantación iónica. Estas medidas se realizan enfriando un sustrato cerámico (sobre el que se coloca la muestra) hasta unos 80K mediante un sistema de expansión de N_2 gas a alta presión por un tubo capilar. Para detectar la corriente es necesario un amplificador de bajo ruido ya que sobre la señal EBIC, de 1nA aproximadamente, se superpone un offset por emisión térmica ambiental de decenas de microamperios.

Figura 1. Eoluxia de CMT sobre CdTe.
Figura 2. Curva EBIC de un detector mesa.

Bibliografía

- Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis.
J. Goldstein Plenum press. New York (1981)
- H.J. Leary, J. Appl. Phys. 53(6) Junio (1982)
- Properties of MCT. Ems Datareviews Series No.3 INSPEC NY(1987)

figura 2.

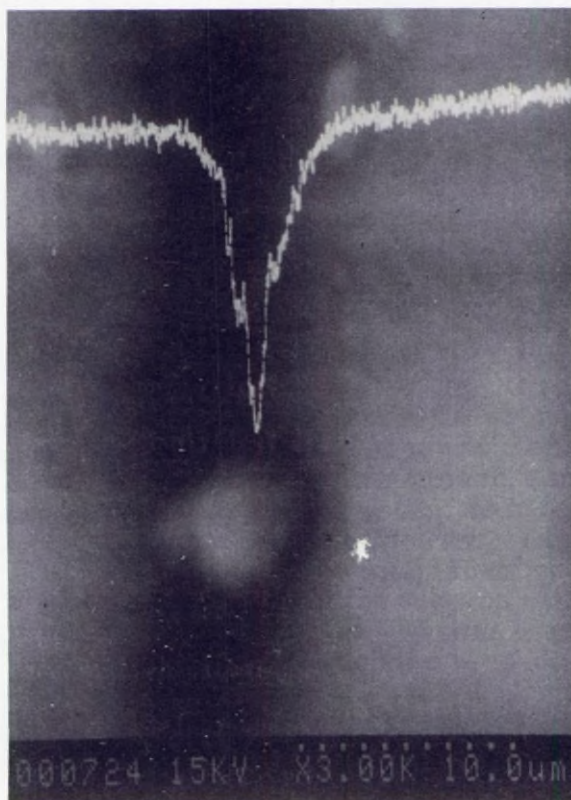
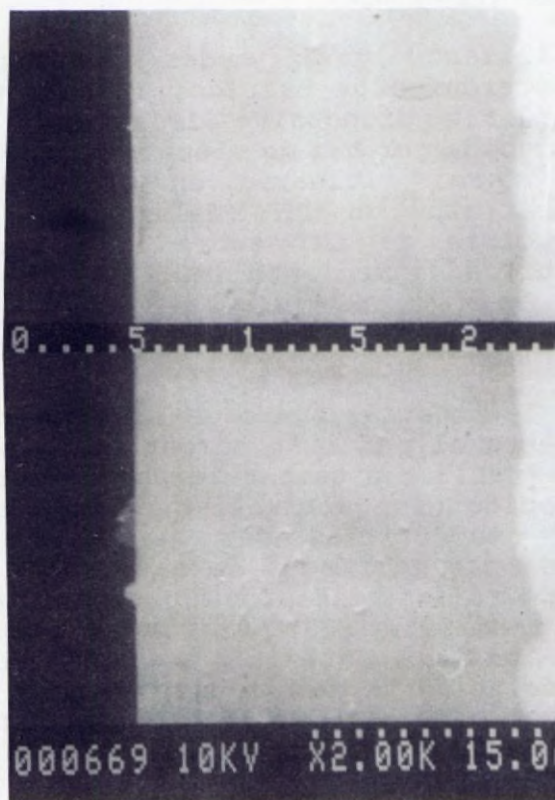


figura 1.



DETERMINACION DE LA RESOLUCION ESPACIAL Y DE LOS FACTORES k DE CLIFF-LORIMER EN UN MICROSCOPIO JEOL-2000 FX.

C. BARBA, J.L. BALDONADO Y F. GARCIA-ALVARADO.

Universidad Complutense. Centro de Microscopia Electrónica.

Introducción: La ecuación de Cliff-Lorimer es una excelente aproximación que permite el microanálisis cuantitativo, utilizando la radiación X característica, de muestras delgadas cuando estas cumplen los criterios de película delgada. Esta ecuación viene dada por: $C_A/C_B = k_{AB} * I_A/I_B$, donde k_{AB} es el factor de Cliff-Lorimer, C_A y C_B son las concentraciones de los elementos A y B de la muestra expresadas en tanto por ciento en peso, I_A y I_B son las intensidades de los picos característicos por encima del ruido de fondo. Esta relación permite el análisis cuantitativo de la muestra sin utilizar patrones, de ahí su utilidad e interés. La determinación de la resolución espacial del microanálisis es otro parámetro de interés para caracterizar un microscopio analítico de transmisión

Material y Métodos: Los valores de k se determinaron a partir de una serie de patrones de minerales bien caracterizados y, de un conjunto de óxidos superconductores, también caracterizados por diferentes técnicas. Las medidas se llevaron a cabo en un microscopio electrónico de transmisión, marca JEOL, modelo TEM 2000 FX, equipado con un espectrómetro marca Link, con un detector de silicio-litio de ventana atmosférica. La resolución de este es de 139 eV FWHM, para la línea K_{α} del Mn. Todos los análisis se efectuaron a 200 kV, 100 segundos de adquisición y un tiempo muerto del 30%. Finalmente, para determinar la resolución espacial se utilizaron unas muestras de aceros especiales preparadas por pulido electrolítico de doble eyección, acondicionadas posteriormente durante treinta minutos en un adelgazador por bombardeo iónico.

Resultados y Discusión:

En la tabla se recogen los datos de cuatro muestras minerales caracterizadas por diferente métodos de análisis complementados con los datos obtenidos en una microsonda. En el gráfico 3 se recogen las k teóricas, las experimentales y las consideradas en el programa de cálculo suministrado por Link, todas ellas referidas al silicio.

Elementos

	Si	Al	Mg	Fe	K	Ti	Na
Patrón 1 (W%)	42,95	38,20	0,12	1,10	16,41	----	----
Patrón 2 (W%)	30,53	15,35	11,95	25,46	13,72	2,99	----
Patrón 3 (W%)	62,97	20,70	----	----	----	----	16,33
Patrón 4 (W%)	33,13	----	48,63	18,24	----	----	----

COMPARACION ENTRE LOS VALORES DE $K_{X/SI}$ TEORICOS, EXPERIMENTALES Y DEL PROGRAMA DE CALCULO.- La tendencia en los tres conjuntos de valores es análoga. Los valores aumentan rápidamente para elementos de menor número atómico que el Si, y de manera gradual para los de mayor número atómico. La correspondencia entre los valores experimentales, los calculados teóricamente y los del programa del espectrómetro es buena.

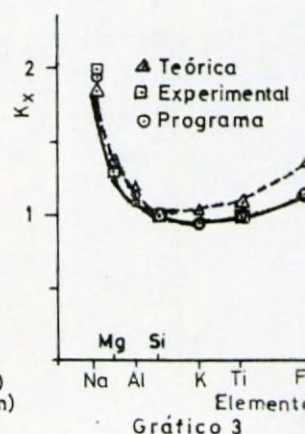
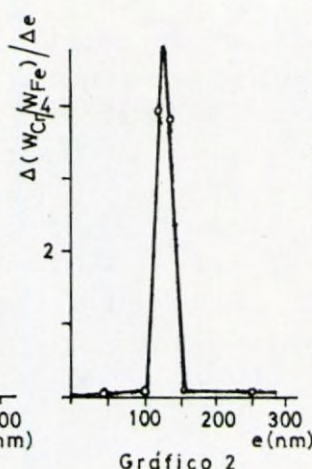
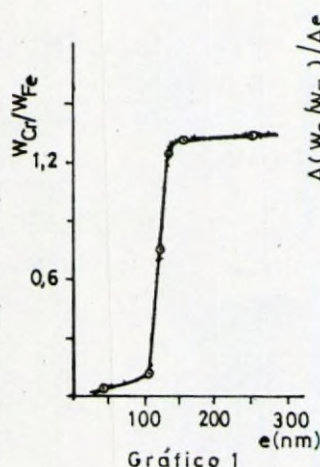
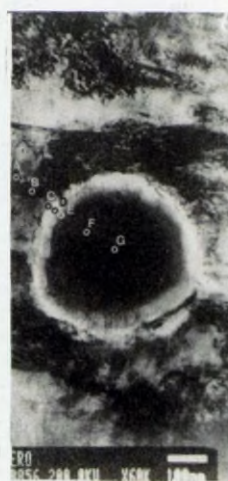
DETERMINACION DE LA RESOLUCION ESPACIAL.- La resolución espacial se determinó en un grano de carburo de las muestras de acero especial, en los puntos señalados en la fotografía 1.

	Punto A	Punto B	Punto C	Punto D	Punto E	Punto F	Punto G
Distancia en nm (e) origen		38	103	117	130	152	250
W% Cr	14,37	14,22	16,33	42,92	55,61	57,65	57,50
W% Fe	85,63	85,78	83,67	57,08	44,39	42,35	42,50

Se siguió el criterio de definir la resolución espacial como la distancia medida entre los puntos en que la razón de concentraciones varía del 5 % al 95 %. De acuerdo con el gráfico 1, la resolución es de 220 Å. Se puede adoptar una definición alternativa. Si se representa la derivada de la razón de concentraciones respecto del espacio frente a éste se puede definir ésta como la mitad de la anchura del máximo a la mitad de su altura. De acuerdo con este criterio, la resolución espacial es de 120 Å, valor que muestra mejor concordancia con las condiciones experimentales.

Bibliografía

- (1) G. Cliff and G.W. Lorimer: J. Microsc., 1975, 103, 203
- (2) J.I. Goldstein, et al.: SEM/1977, ed. O. Johari, Chicago ITRI, 1977, 315.
- (3) G.W. Lorimer, G. Cliff and J.N. Clark: "Developments in electron microscopy and analysis 1975", ed. J.A. Venables, London, Academic Press, 1977, 153.
- (4) M. Green and V.E. Coslett: Proc. Phys. Soc., 1961, 78, 1206.
- (5) W. Bambynek, B. Crasemann, et al.: Rev. Mod. Phys., 1972, 44, 716.
- (6) K.F.J. Heinrich, C.E. Fiori, and R.L. Myklebust: J. Appl. Phys., 1979, 50, 5589.



SINTESIS DE UN OXIDO NO-ESTEQUIOMETRICO DE PRASEODIMIO ESTUDIO TEXTURAL

S. Bernal; F.J. Botana; A. Jobacho y J.A. Pérez Omil

Departamento de Química Inorgánica
Facultad de Ciencias. Universidad de Cádiz

Introducción: En el presente trabajo se describe la síntesis y caracterización química, estructural y textural de un óxido de praseodimio que se utilizará como fase soporte de rodio altamente disperso. Dicho catalizador constituye un interesante sistema modelo para el estudio del efecto SMSI (1-3). De acuerdo con la aplicación prevista, se ha perseguido la preparación de un óxido estructuralmente bien definido, con bajo contenido en impurezas aniónicas, especialmente carbonatos, un desarrollo superficial medio/alto, y una elevada resistencia a la sinterización.

Material y Métodos: Los reactivos utilizados fueron: nitrato de praseodimio hexahidrato, Aldrich, del 99.9 % de pureza; y una disolución de amoníaco concentrado, Merck p.a.. Las técnicas instrumentales aplicadas en el presente estudio fueron: Análisis Termogravimétrico (TG), Descomposición Térmica Programada/ Espectrometría de Masas (DTP-EM), Espectroscopía IR, Difracción de Rayos X y Adsorción de N_2 a 77 K. El estudio mediante SEM y TEM del precursor y óxido final se ha realizado en equipos JEOL 820 y JEOL 2000 EX del Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Cádiz.

Resultados y Discusión:

La preparación del Pr_6O_{11} consistió en la descomposición térmica, en atmósfera dinámica de helio, de una fase precursora obtenida por precipitación con amoníaco de una disolución acuosa de nitrato de praseodimio (III). Tanto el precursor, como la fase final óxido se caracterizaron mediante la aplicación sistemática de las técnicas anteriormente mencionadas. Dicho estudio permitió establecer las condiciones precisas de preparación del óxido, que fueron las siguientes: calcinación en atmósfera dinámica de He (Flujo He: $1 \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$), a una velocidad de calentamiento de $5 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1}$, hasta 973 K, seguido de un tramo isoterma, a 973 K, de 1 h, y posterior enfriamiento

hasta 298 K, igualmente en flujo de He. El óxido preparado de esta forma presentaba un diagrama de DRX en buena correspondencia con el de la fase Pr_6O_{11} , una superficie BET de $32 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, y, de acuerdo con los diagramas de DTP-EM, un bajo contenido en carbonatos residuales.

El análisis de las isotermas de adsorción de N_2 a 77 K, junto con los datos obtenidos mediante la aplicación de las microscopías electrónicas de barrido y transmisión, Figuras 1 y 2, ha permitido un estudio detallado de las propiedades texturales de precursor y óxido final, así como del comportamiento frente a la sinterización, en alto vacío y en atmósfera dinámica de hidrógeno, de este último. Según se ha comprobado, el óxido preparado no experimenta modificación significativa de su superficie BET cuando se calcina, en vacío, hasta temperaturas de 973 K; incluso, en atmósfera reductora de H_2 , la sinterización observada es muy discreta, observándose una disminución de la S BET hasta $25 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, tras un tratamiento a 995 K.

Bibliografía

- 1) S.J. Tauster; S.C. Fung y R.L. Garten; J. Am. Chem. Soc. 100, 170 (1978).
- 2) M.G. Sánchez y J.L. Gázquez; J. Catal. 104, 120 (1987).
- 3) J. Cunningham, S. O'Brien, J. Sanz, J.M. Rojo, J.A. Soria y J.L.G. Fierro; J. Molec. Catal. 57, 379 (1990)

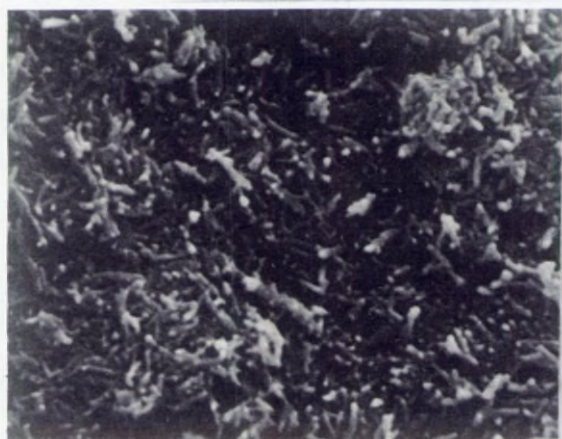


Fig. 1

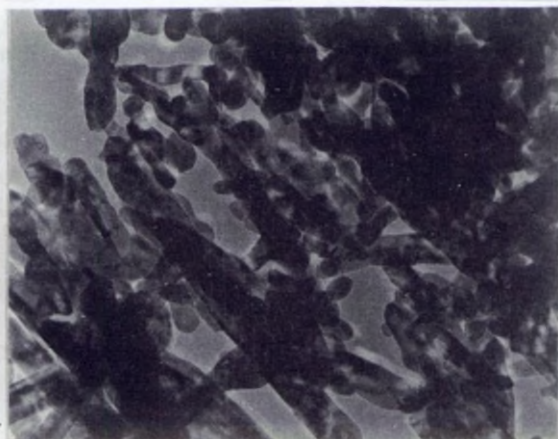


Fig. 2

MICROANÁLISIS DE CERÁMICAS ROMANAS POR MICROSCOPIA ELECTRONICA

F. Bosch Reig, M.T. Domenech Carbó,* V.

Peris Martínez y J.V. Gimeno Adelantado.

Departamento de Química Analítica, Fac. Química

Sección Departamental de Conservación y Restauración*

Universitat de València. Universidad Politécnica

de Valencia.*

El análisis cuantitativo de materiales cerámicos arqueológicos por el gran valor de los mismos, exige consumir pequeñas cantidades de muestra.

Las determinaciones por vía húmeda clásica no son prácticas, mas que por la cantidad de muestra a destruir, por ser muy laboriosas, por lo que se han buscado métodos instrumentales: activación neutrónica (1-2), excesivamente sofisticada; mientras que la FRX o la MEB presentan la gran dificultad de los efectos interelementales.

En la presente comunicación se aplica un método de corrección de efectos interelementales: método de dilución límite (MDL), desarrollado por los autores para FRX (3).

Material y Métodos: Reactivos: Acido bórico Probus r.a.

Aparatos:

- Microscopio electrónico de barrido Hitachi S-2500 con unidad computerizada para microanálisis KEVEX.

- Mortero de bolas de ágata y molino Fritsch Pulverisette.

Método: Molturar 30 min., por separado, el ácido bórico y la cerámica. Mezclar en el molino durante 15 min., cantidades de problema entre 0,35-1 g y de ácido bórico entre 0,65-0 g. La mezcla obtenida se prensa a 10 Tm en una matriz diseñada al efecto, adquiriendo forma de pastilla de 11 mm ø.

Resultados y Discusión: Con los resultados experimentales obtenidos de señal instrumental (I), aplicamos el MDL para corregir los efectos interelementales; para ello se representa gráficamente los valores $f_1 \cdot I_1/I_2$ obtenidos para varias diluciones de las muestras frente a los cocientes de los factores de dilución, f , [$f = g \text{ muestra}/(g \text{ muestra} + g \text{ diluyente})$] respectivos f_1/f_1 . Esta relación resulta lineal y la ordenada en el origen es el que denominamos "factor de corrección de la matriz". Este parámetro da lugar a los parámetros de corrección que aplicados sobre la señal medida por el aparato permite calcular los valores corregidos que linealizan las curvas de calibrado.

Mediante el método propuesto y descrito sucintamente, se efectúa el análisis cuantitativo de los seis componentes mas característicos de los materiales cerámicos

de las muestras cuya caracterización y descripción aparece en la Tabla 1. La composición química ha sido expresada como óxidos, por ser esta la forma usual de dar los resultados del análisis para este tipo de muestras. Los resultados aparecen en la Tabla 2. Con los datos obtenidos se efectúa un análisis "clúster" a dos niveles diferentes de variables y cuyos dendrogramas se representan en la figura adjunta y que presentan como característica común distancias de amalgamación relativamente bajas ($\leq 2,514$).

Muestra	Características	Procedencia	Referencia	Muestra	K ₂ O	CaO	TiO ₂	Fe ₂ O ₃	Al ₂ O ₃	SiO ₂
1	Frag. marmita, tamaño mediano, rojo	Norte Africa	RE 31-3020	1	3,99	4,19	0,85	3,98	18,60	67,90
2	Frag. marmita, tamaño mediano, roja	Norte Africa	AE 319065	2	1,08	1,58	0,87	4,68	18,00	52,91
3	Frag. de ánfora, tamaño mediano, rojo	Sur Tuner	-	3	1,27	1,66	0,69	12,30	14,41	62,72
4	Calceira, tamaño pequeño, rojo claro	Itiza	-	4	1,72	3,37	0,77	4,22	16,79	68,09
5	Frag. ánfora, tamaño pequeño, roja clara	Itiza	-	5	2,46	24,20	0,88	5,57	18,58	48,82
6	Frag. ánfora, tamaño pequeño, roja clara	Can Fita (Itiza)	CF 1505-1-14	6	1,74	23,01	0,62	4,51	11,77	49,87
7	Frag. pequeño, rojo claro	Can Fita (Itiza)	CF-88 UE 203	7	1,43	8,13	0,64	6,26	14,91	61,61
8	Frag. cerámica Itiza, tamaño pequeño, marrón claro	Can Fita (Itiza)	CF-88 OE 204	8	1,31	33,50	0,54	3,68	8,94	42,00
9	Frag. ánfora, tamaño pequeño, marrón claro	Can Fita (Itiza)	CF 1588-1-13	9	0,84	63,40	0,50	4,09	6,44	21,40
10	Frag. pequeño, marrón claro	Sondeo 13 (Itiza)	CF-88-1302	10	0,88	54,20	0,61	4,33	6,50	24,40

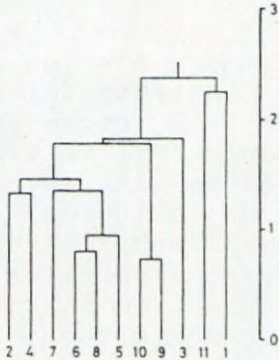
Bibliografía (1).SAYRE, E.E.;Brookhaven National Laboratory Report BNL-9614, 1965.

(2).OLIN, J.E. and SAYRE E.W.; International Conf. on the Application of Nuclear Methods in the Field of Works of Art., Roma-Venecia 24-29 May 1973.

(3).BOSCH REIG, F.; DOMENECH CARBO, M.T.; PERIS MARTINEZ, V. and GIMENO ADELANTADO, J.V.; Spectrochim. Acta, 43B, 811, 1988.



Dendrograma. Variables, composición química expresada como óxidos



Dendrograma. Variables, composición química normalizada al hierro.

ESTUDIO POR MICROSCOPIA ELECTRONICA DE ESTRUCTURAS SiO_2/Si IMPLANTADAS CON FOSFORO.

S.A.Bota, J.Portillo, A.Cornet, J.R.Morante

Laboratori de Caracterització de Materials per la Microelectrònica.
Departament de Física Aplicada i Electrònica.
Universitat de Barcelona. Diagonal 645. Barcelona 08028.

Introducción: La incesante reducción de dimensiones hace necesario disponer de herramientas de análisis que nos ofrezcan una resolución adecuada a las dimensiones de nuestras estructuras; tal posibilidad nos la brinda la microscopía electrónica de transmisión (TEM). El TEM con una resolución cercana a 2\AA , resulta imprescindible para el estudio de problemas relacionados con el proceso de dispositivos VLSI [1]. Es una de las pocas técnicas que por su resolución permite obtener información relativa a la configuración atómica local de una interface [2]; también es ampliamente utilizada para la detección de defectos en el sustrato semiconductor asociados al proceso de implantación iónica, siendo la única técnica que permite distinguir entre diferentes tipos de defectos [3].

Material y Métodos: Las muestras analizadas son estructuras óxido de silicio/silicio implantadas con fósforo. El P ha sido implantado con diferentes dosis comprendidas entre 10^{11} y 10^{13} átomos/cm², con una energía de implantación de 180 keV. A continuación las muestras han sido sometidas a recocido térmico mediante horno convencional a 900 °C durante 30 minutos o bien a un proceso térmico rápido (RTA) a 1150 °C durante 10 segundos. Parte de estas muestras han sido metalizadas con el fin de disponer de estructuras MOS. Posteriormente las muestras han sido preparadas para su observación mediante cross-sección. Para las observaciones se ha utilizado un microscopio Hitachi 800 NA con una resolución punto a punto de 2.7 Å.

Resultados y Discusión:

En la figura 1 se presenta una micrografía TEM en alta resolución de la interface $\text{SiO}_2\text{-Si}$ correspondiente a una de las estructuras, en ella aparece la imagen de la familia de planos atómicos $\langle 1\ 1\ 1 \rangle$ del silicio, la separación entre líneas es de 3.43 Å, este dato nos permite una autocalibración interna de la micrografía. Se observa una transición bastante abrupta entre el óxido y el Semiconductor. Tan solo en un estudio más detallado de la interface -casi a nivel atómico- puede verse como ésta no es completamente plana sino que presenta una cierta rugosidad. Varios autores como Krivanek et al. [2] observan una interface que aparece escalonada y/o modulada. Otros autores [4] no detectan la presencia de escalones, aunque observen una interface bastante rugosa.

Este segundo caso es el que se presenta en nuestras micrografías, en ellas se observa una interface rugosa aunque sin ningún tipo de modulación. La rugosidad medida para las diferentes muestras es siempre del orden de 8 Å. El sustrato de silicio aparece libre de defectos cristalográficos bidimensionales o tridimensionales (no nos es posible detectar la presencia de defectos puntuales); esto es debido a que las dosis utilizadas, usuales en tecnología VLSI, son demasiado bajas para propiciar la aparición de defectos más complejos (en el caso del P, éstos no aparecen para dosis de implantación inferiores a $2 \cdot 10^{14}$ átomos cm^{-2}).

Con las estructuras MOS alojadas en el interior de la cámara de observación de un microscopio de barrido JEOL JSM-840 se ha podido presenciar cuando aparece la ruptura dieléctrica del óxido, originada por estrés eléctrico "breakdown". Tal como se observa en la pantalla del microscopio y en la micrografía de la figura 2, cuando se aplican campos eléctricos del orden de $6.25 \cdot 10^5$ Volt/cm aparecen pequeñas microrupturas en el óxido de aproximadamente 2-3 micras de diámetro que provocan la paulatina degradación del dispositivo. El análisis de las cinéticas de captura de carga eléctrica en el interior del óxido realizadas mediante técnicas de fotoinyección parecen confirmar que este fenómeno sí está correlacionado con los parámetros de implantación del fósforo [5].

Bibliografía:

- [1] R.B.Marcus, T.T.Sheng, "Transmission Electron Microscopy of Silicon VLSI circuits", John Wiley & Sons, (1983).
- [2] O.L.Krivanek, D.C.Tsui, T.T.Sheng, A.Kamgar. "The Physics of the SiO_2 and its interfaces", ed. by S.T.Pantelides, Pergamon Press, pág 336, (1978)
- [3] K.S.Jones, S.Prussin, E.R.Weber. Appl. Phys A, **45**, 1-34, (1988)
- [4] A.H.Carim, R.Sinclair. J.Electrochem.Soc., **134**, 741, (1987)
- [5] S.A.Bota, J.Portillo, J.M.Lopez-Villegas, J.R.Morante. Comunicación de la V escuela de Microelectrónica, pág 257-260, Granada, (1990)

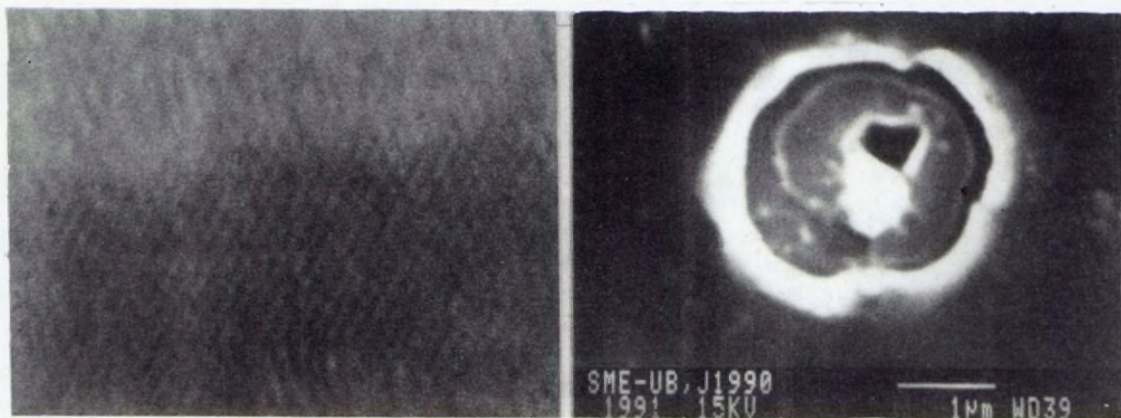


Figura 1. Micrografía HRTEM de la interface (SiO_2/Si) (izquierda)

Figura 2. Micrografía SEM de una microruptura en el óxido (derecha)

CARACTERIZACION DE CATALIZADORES Rh/TiO₂ POR MICROSCOPIA ELECTRONICA DE ALTA RESOLUCION

J.J.Calvino, M.A. Cauqui, G. Cifredo y R. García

Departamento de Química Inorgánica

Facultad de Ciencias. Universidad de Cádiz.

Introducción: Los catalizadores constituidos por metales dispersos sobre óxidos reducibles presentan el efecto conocido como Interacción Fuerte Metal Soporte (SMSI). Dicho efecto consiste en que una reducción del catalizador a alta temperatura (500°C) produce una inhibición de las propiedades características del metal (1). La explicación más comúnmente aceptada en la bibliografía admite que, en virtud del proceso de reducción, el soporte adquiere movilidad y tiende a cubrir las partículas de metal (2). Obviamente, la aplicación de la Microscopía electrónica de Alta Resolución puede contribuir a clarificar el mecanismo propuesto para el efecto SMSI.

Material y Métodos: Se han preparado sistemas 5% Rh/TiO₂ por impregnación de un dióxido de titanio con disolución de nitrato de rodio, secado en estufa a 90°C y calcinación posterior en aire a 400°C. A continuación se redujo a 200°C y a 500°C durante tres horas, en flujo de hidrógeno y se realizó un tratamiento de pasado en flujo de gas inerte. Las muestras se depositaron sobre rejillas de cobre para observación en TEM y se caracterizaron por HREM en un microscopio JEM2000EX, con resolución estructural de 2.1 Å. En paralelo al estudio por ME se realizaron otros ensayos orientados a establecer que tras la reducción a 500°C el catalizador estudiado se encuentra, en efecto, en estado SMSI.

Resultados y Discusión: Las micrografías de HRTEM que se presentan en este trabajo pueden considerarse representativas del comportamiento observado al microscopio para las muestras de Rh/TiO₂ reducidas a 200°C y 500°C. En ambos casos se observa una resolución que permite la clara identificación de las partículas de metal, así como de sus tamaños. Se aprecia que la dispersión metálica es alta y homogénea, sobre todo tras la reducción a 200°C que da lugar a tamaños de partícula de rodio comprendidos entre 1,0 y 4,5 nm.

Otro efecto a comentar es la aparición de relaciones de orientación bien definidas entre los microcristales de rodio y el soporte de óxido de titanio. Este aspecto, que no ha sido destacado por ningún autor en trabajos anteriores de metales dispersos sobre TiO₂, pudiera ser indicativo de la existencia de

una forma de interacción distinta entre la fase metálica y el soporte.

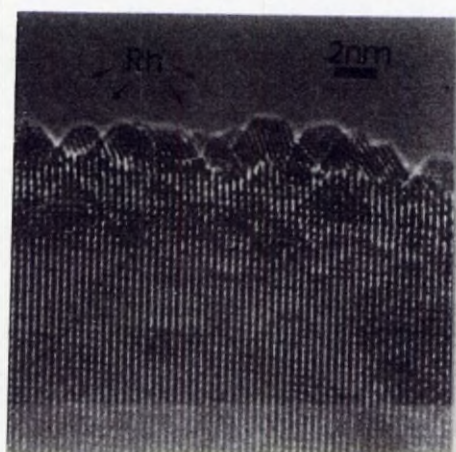
Por lo que respecta a los fenómenos de cubrimiento de partículas de metal por material proveniente del soporte pueden afirmarse que tras reducir a 200°C no se observan, mientras que a 500°C las partículas de rodio aparecen parcialmente cubiertas de fases que pudieran estar constituidas por óxidos de titanio amorfo. No obstante incluso a 500°C, se observa que una fracción importante de la superficie metálica aparece limpia. Estos datos nos obligan a discutir dos aspectos: a) ¿Ocurrió algún fenómeno de reoxidación que induzca cambios en la muestra durante la exposición al aire necesaria para montar la muestra sobre la rejilla de cobre?, y b) ¿Existe algún mecanismo de interacción fuerte metal-soporte alternativo al más aceptado en la bibliografía?

Los resultados obtenidos con otras técnicas como ISS, medidas de actividad catalítica, junto con una revisión de los trabajos previos de interacción metal-soporte en sistema Rh/TiO₂ (3-5), sugieren que el efecto SMSI puede estar asociado a varios factores, y no solo al cubrimiento de partículas metálicas por material proveniente del soporte.

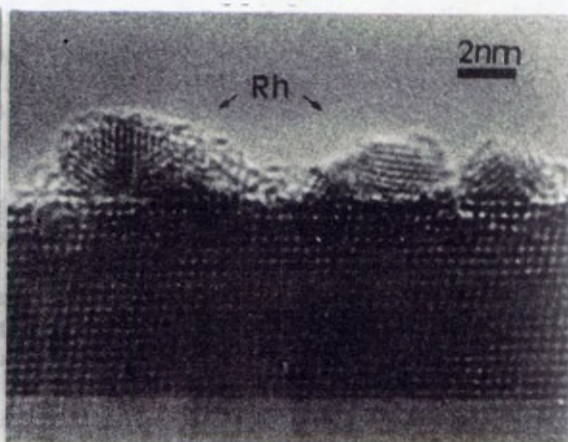
Bibliografía

- 1.- S.J. Tauster, S.C. Fung y R.L. Garten; J.Am.Chem.Soc.; 100, 170 (1978)
- 2.- J.Santos, J.Phillips y J.A.Dumesic; J.Catal., 81, 147 (1983)
- 3.- M.T. Blasco, J.C. Conesa, J. Soria, A.R. Gonzalez-Elise G.Munuera, J.M.Rojo y J.Sanz; J.Phys.Chem., 92, 4685 (1988)
- 4.- J.H.A. Martens, R.Prins, H.Zandbergen y D.C. Koningsberger J.Phys.Chem., 92, 1903 (1988)
- 5.- G.L. Haller y D. Resasco; Adv. Catal., 36, 173 (1989)

200°C



500°C



UTILIDAD DE LA MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION EN LA CARACTERIZACION DE CATALIZADORES DE COBALTO PROMOVIDOS POR LANTANO

F.J. Calvino, G. Cifredo, J.M. Rodríguez-Izquierdo y H. Vidal

Departamento de Química Inorgánica
Facultad de Ciencias. Universidad de Cádiz

roducción: Los catalizadores de cobalto soportado sobre un mate
al como la sílice o la alúmina se consideran de alto interés
ra la síntesis de hidrocarburos superiores a partir de la mez
a $\text{CO} + \text{H}_2$ (1). La adición de un tercer componente, denominado
néricamente promotor, conduce a una mejora destacable de la
tividad; es el caso del óxido de lantano (2,3). Dado que los
ectos sobre la actividad deben estar relacionados con la es
uctura a escala atómica y con el grado de dispersión de las
ses activas, en este trabajo se aborda el estudio por TEM de
ses catalíticas que contienen Co-La-SiO₂ y la comparación de
tos resultados con los de otras técnicas de caracterización.

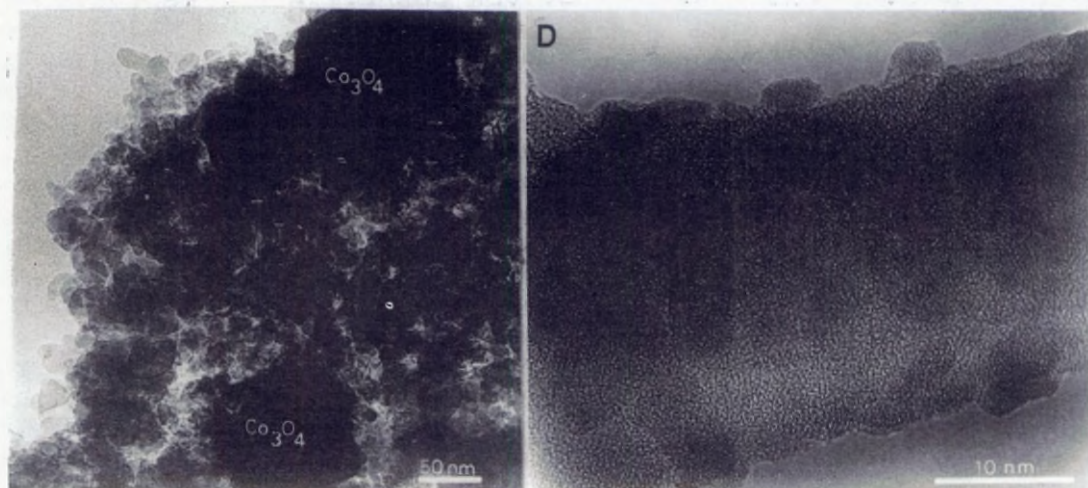
aterial y Métodos: La sílice utilizada como soporte (Cabot M5, con
0 m²·g⁻¹) se sometió a impregnaciones con disoluciones de ni
atos, seguidas de calcinación al aire a 600°C. Los catalizado
s La/SiO₂ (A) y Co/SiO₂ (B) requirieron una única etapa de
pregnación. La muestra La/Co-SiO₂ (C) se obtiene a partir de
/SiO₂ tras un segundo proceso de impregnación y calcinación a
0°C. La muestra Co/La-SiO₂ (D) se prepara siguiendo un proce
análogo a partir de La/SiO₂. Las cargas de Co y óxido de lan
no fueron 10% y 27% respectivamente. Las muestras se montaron
grids de cobre con película de carbón agujereado y se estu
aron en un microscopio JEM2000EX con 2.1 Å de resolución.

ultados y Discusión: En las micrografías de la muestra A, de
/SiO₂, se observan pequeñas partículas (4,0-5,0 nm) de carác
r amorfo, distribuidas sobre la superficie del soporte. Estos
tos están en buen acuerdo con los obtenidos por rayos X y es
ctroscopía Raman, técnicas con las que no se aprecia ningún pi
característico de la existencia de fases cristalinas. Este
sultado puede calificarse como original dado que en la biblio
afía no aparecen datos previos indicativos de que los elemen
s lantánidos se dispersen bien sobre la superficie de la síli
Por lo que respecta a la muestra de Co/SiO₂, por difracción
RX y Raman se aprecia que el Co aparece en forma de Co₃O₄.
base a los datos de anchura de pico de difracción se estima
tamaño promedio de cristal para la fase Co₃O₄ de 50 nm. La
icroscopía electrónica confirma que la dispersión del cobalto
muy pobre en esta muestra, y que la fase en que se presenta

el metal es la arriba indicada. Sin embargo en las fotos se aprecian partículas de óxido de cobalto de carácter policristalino con tamaños muy superiores, comprendidos entre 150 y 400 nm. Debe destacarse que en un caso como el presente, en que la dispersión de una fase soportada es muy baja, las técnicas espectroscópicas de análisis de superficies, como XPS o ISS, presentan limitaciones para determinar el tamaño real de dichas partículas, mientras que dicha información es muy fácil de obtener por TEM. Las muestras C y D contienen a la vez Co y La pero difieren de forma drástica en sus propiedades. Las micrografías obtenidas permiten apreciar que la adición del lantano en una segunda etapa de impregnación da lugar a una fase Co_3O_4 mal dispersa y una fase amorfa, asociada al La, bien dispersa como en el caso de la muestra A. Por contra, si se añade el cobalto en el segundo término, muestra D, se aprecian únicamente sobre la superficie del soporte pequeñas partículas amorfas que deben corresponder a una fase mixta conteniendo Co y La. Este resultado destaca la importancia de la forma en que se depositan el metal y el promotor para lograr el efecto catalítico deseado. Estos aspectos de detalle no suelen considerarse con la atención necesaria en la preparación de catalizadores promovidos.

Bibliografía

- 1.- T.H. Fleish, R.F. Hicks y A.T. Bell; J. Catal, 87, 398 (1984)
- 2.- J.S. Ledford, M. Houalla, A. Proctor, D.M. Hercules L. Petrakis; J. Phys. Chem., 93, 6770 (1989)
- 3.- R. Kieffer, A. Kiennemann, M. Rodriguez, S. Bernal J.M. Rodriguez-Izquierdo; Appl. Catal., 42, 77 (1988)



Aplicación del SEM al Análisis de Fallos de Componentes Electrónicos

José María Cervero Clerencia y Quiliano Pérez Tarrero

Calidad y Fiabilidad

Telefónica Investigación y Desarrollo

Introducción:

La creciente complejidad de los dispositivos utilizados en los equipos electrónicos y de telecomunicación exige el empleo de nuevas técnicas para asegurar su calidad y fiabilidad. El microscopio electrónico de barrido, sobre todo en algunos de sus modos de funcionamiento (electrones secundarios, retrodispersados, EBIC, contraste de tensión, etc.) se ha convertido en un equipo fundamental para este tipo de actividades.

Material y Métodos:

La exposición se ha basado en los análisis de fallos de circuitos integrados utilizados en equipos de telecomunicación realizados con ayuda de un SEM de emisión de campo modelo S-4000 de la casa Hitachi. Los modos de funcionamiento que se han empleado son electrones secundarios y retrodispersados.

Resultados y Discusión:

El objetivo fundamental del análisis de fallos de componentes electrónicos es conocer la causa real del fallo para seleccionar el componente más adecuado en una determinada aplicación o incorporar las modificaciones necesarias con el fin de evitar el fallo. De esta forma el análisis de fallos constituye una herramienta indispensable para mejorar y asegurar la fiabilidad de los equipos electrónicos.

Con carácter general un análisis de fallos supone en primer lugar realizar una caracterización eléctrica, para verificar el fallo y en caso afirmativo proponer la hipótesis de la posible causa o zona afectada, y un examen visual interno con el fin de determinar el mecanismo actuante.

Para la realización de este examen visual interno se ha venido utilizando tradicionalmente el microscopio óptico, básicamente por su simplicidad. No

obstante debido a la miniaturización y complejidad que caracteriza hoy en día a los componentes electrónicos su utilización se ha hecho insuficiente fundamentalmente por su bajo poder de resolución y su pequeña profundidad de campo, haciéndose necesario en muchos casos el empleo de un SEM.

Otra característica que hace del SEM un equipo indispensable para este tipo de aplicaciones es su gran versatilidad. En su modo básico de funcionamiento (electrones secundarios) se pueden obtener resultados óptimos en cuanto a resolución y contraste topográfico se refiere, como se muestra en las Figuras 1 y 2, correspondientes a defectos encontrados en las pistas metálicas de un CI VLSI originados por un sobreesfuerzo eléctrico. Para la determinación de diferentes fases e identificación de elementos en una determinada zona de la muestra, se cuenta con la ayuda de los electrones retrodispersados y el microanálisis de rayos-X respectivamente. En la Figura 3 se muestra la imagen en electrones retrodispersados de un fenómeno de electromigración de Ag entre tintas conductoras. Igualmente existen otras técnicas cuyo objetivo es estudiar la respuesta eléctrica del dispositivo, como el contraste de tensión en sus distintas categorías y el modo EBIC que trata de analizar los efectos eléctricos producidos en la muestra como consecuencia de la penetración del haz electrónico.

Bibliografía

"Failure & Yield Analysis Handbook". D.L. Burgess & O.D. Trapp.

"Microelectronics Failure Analysis Techniques A Procedural Guide"

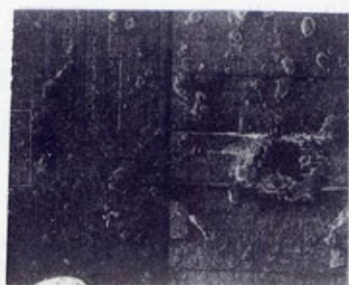


Figura 1 (X350, X5)



Figura 2 (X500)

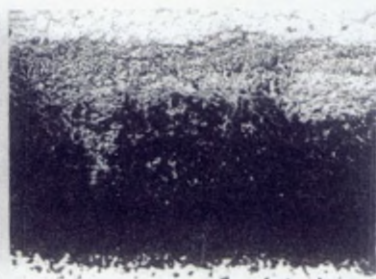


Figura 3 (X350)

USE OF XPS/ESCA AND SEM TO STUDY THE SURFACE OF CHLORINATED WOOL FIBRES TREATED VIA LIPOSOMES

M.D.de Castellar¹, J.M.Tura¹, A.de la Maza², F.Garcia³ and J. Pujadas³

¹Lab.Tèc.Fís.Anàl., ITQT, CSIC., J.Girona Salgado, 18. 08034-Barcelona. ²UEI-Tèc.Quím., ITQT, CSIC. Barcelona. ³Institut d'Estudis Catalans. Barcelona.

Introduction. When keratin fibres are treated with aqueous chlorine solutions a process which usually is adapted to render wool unshrinkable they undergo more or less extensive chemical modifications in wool structures. The chlorination process preferentially oxidises cystine residues to cysteic acid residues in acidic solutions, such oxidation occurs via intermediate oxidation products (1,2). Liposomes are artificial phospholipid vesicle structure which are rapidly gaining a widespread use, not only as a suitable membrane model but also in technological applications as carrier of hydrophilic and lipophilic chemicals. This has been investigated by using XPS/ESCA and SEM.

Material and methods. Multilamellar vesicle liposomes (MLV) of defined size (400 nm) made with phosphatidilcholine (5mM) and containing sodium hypochlorite solution (0.28% w/v) was used prepared following a method described by Bangham (3). Washed Merino wool top (1 g) was treated with MLV liposomes (70 ml) freshly prepared after adjusted the pH value to 1.5. The treatment was carried out for 15 min at 20 °C. After treatment sample was treated with sodium metabisulphite (1%); bath ratio 1/30 during 5 minutes. The samples were analyzed by x-ray photoelectron spectroscopy (XPS/ESCA) and scanning electron microscopy (SEM).

Results and discussion. The ESCA spectra recorded from the chlorinated whole wool fibres treated with the oxidative reagent directly or via liposomes will only give information about changes taken place on the fiber surface (ca 5-10 nm depth) (4). The S 2p photoelectronic peak was studied in the untreated and treated samples. The S 2p spectrum region of the untreated wool fibers surface (A) contains only one peak at 164.1 eV which is attributed to cystine residues. The spectra of chlorinated wool fibers surface treated directly (B) or via liposomes (C) contain two clear peaks:

164.1 eV corresponds to cystine residues

169.7 eV corresponds to cysteic acid residues

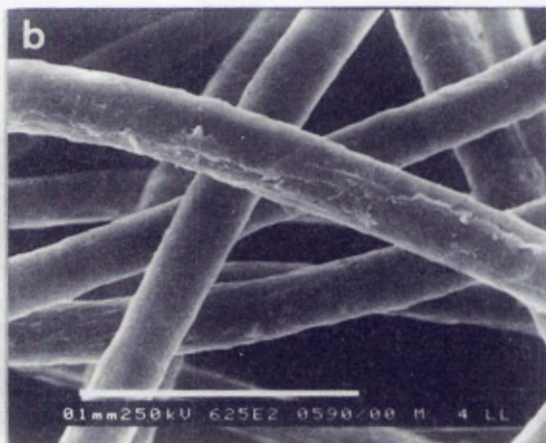
Comparing the contents of cysteic acid residues in samples (B) and (C), it can be seen that the use of liposomes in wool chloro-

ration inhibit the formation of this intermediate cystine oxidation product.

In order to determine the regularity of chlorine treatments in wool fiber, studies using SEM were carried out, comparing chlorinated wool samples treated directly with chlorine aqueous solutions or via liposomes. The figure consists of different SEM photomicrographs of chlorinated wool samples. It can be seen that acidic chlorination via liposomes (sample a) promotes lesser damage in wool structures than acidic chlorination using directly aqueous chlorine solutions (sample b), being in the first case the regularity of the chlorination clearly improved. In that way it may be assumed that the use of liposomes as vehicle of the oxidative reagent in wool chlorination, promotes an inhibition and a modulation in the formation of cysteic acid that could be investigated quantitatively and qualitatively using ESCA and SEM techniques.

Bibliography

1. McLaren, J.A. and Mulligan, B. "The chemical reactivity of the wool fibre". Wool Science, Marrickville, NSW: Science Press (1981).
2. Prömpfer, E., Klee, D. et al. *Textilveredlung* 18, n.11: 330-34 (1983).
3. Bangham, A.D., Standish, M.M. et al. *J.Mol.Biol.* 13:238 (1965).
4. Setiawan, L.D., Baumann, H. et al. *Surf.Interface Anal.* 7:18 (1985).



STUDY OF REACTION LAYERS FORMED ON MOLYBDENUM IN A LUBRICANT OIL AT DIFFERENT TEMPERATURES BY SEM, XPS AND XRD

M.D. de Castellar¹, J.M. Tura¹, A. Traveria¹, J. Pujadas² and A. Montero².

¹Lab.Tèc.Fis.Anàl., ITQT, CSIC. J.Girona Salgado, 18. 08034-Barcelona. ²Institut d'Estudis Catalans. Barcelona.

Introduction. Tribology deals with the interaction of surfaces in relative motions. This is an interdisciplinary field that requires the collaboration of solid state and surface physics, chemistry, material science and mechanical engineering. In spite of its importance, there is no complete understanding of interactions in tribological interfaces. The application of surface analytical methods, like SEM/EDXA or XPS/ESCA has greatly expanded the possibilities for the study of complex mechanisms, such as lubricated contacts between metal-metal sliding surfaces.

Material and methods. Two series of blowlamp sprayed Mo on brass test pins were studied: 1) pins frictioned in a pin-on-disk tribometer fitted with a temperature controlled bath (between -10°C and +120°C); 2) unworn test pins immersed in a temperature controlled bath (between room temperature and 120 °C) during four hours. The same oil XT1536 was used in both series of experiences. One untreated sample was used as a standard. The pin-on-disk tribometer was a prototype equipped with a stainless steel counterpart disc. The analytical methods used were: 1) SEM Philips 515 fitted with an EDAX; 2) XPS/ESCA, V.G. Scientific MKII; 3) XRD Siemens D500.

Results and discussion. Tribological results. The friction coefficient of this type of Mo coatings is almost independent of the applied load and sliding velocity. The only regime of lubrication observed was boundary lubrication. As it may be seen in Figure 1, the friction coefficient (f.c.) ranged from 0.10 at -10°C to 0.115 at 80°C. It may be observed that the variation of the f.c. versus temperature is very low, but has a tendency to increase. It is worth noting that the f.c. obtained at 120°C is lower than the value at 80°C, indicating that other phenomena than viscosity variation may be present at this temperature range.

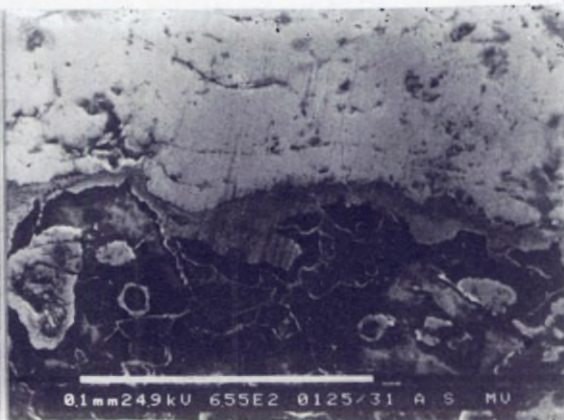
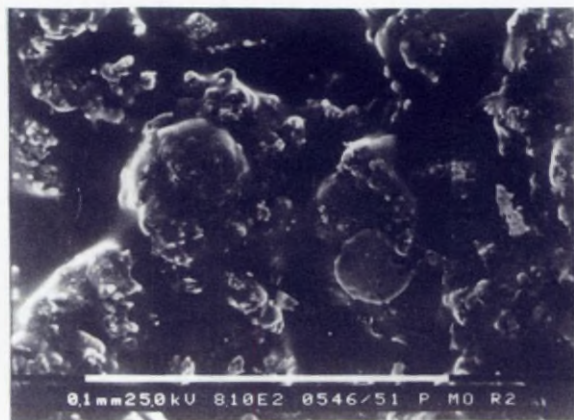
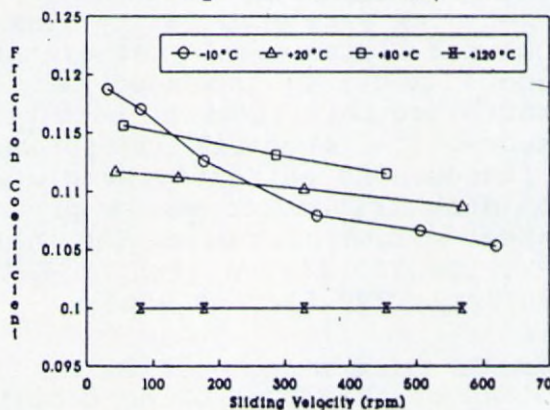
SEM. The observation of a Mo unworn specimen (Fig.2) shows the characteristic morphology of a sprayed coating. The cross-section of an unworn Mo (Fig.3) revealed a good contact zone bet-

ween coating and substrate, as well as a good fundamental elongated structure of the initially impacted sprayed drops.

XPS. The C_{1s} (285 eV) photoelectronic peak of the unworn sample at room temperature corresponds to the residual hydrocarbons $(CH_2)_n$ in the chamber of the spectrometer. In the specimens thermally treated, such a peak may also be attributed to the hydrocarbons of the oil XT1536. When the treatment temperature increases, a chemical shift of the C_{1s} peak towards a higher binding energy was observed. At the highest temperature (120°C) it appears a peak at 288.7 eV, which following the literature could correspond to carboxylic groups.

XRD. Unworn Mo coatings. The interpretation of the XRD diagrams pointed out the presence of two phases; Mo^0 as majority and MoO_2 at a lower proportion. It has not been possible to identify MoO_3 by XRD, probably by one of the following circumstances or by both together: a) the MoO_3 coating layer is too thin, and b) because of the disorder of the phase. At the highest temperatures one reduction process could take place: $Mo^{6+} \rightarrow Mo^{5+} \rightarrow Mo^{4+}$. In addition, the acid radicals detected by XPS/ESCA analysis could react with a molybdenum unstable oxide (Mo^{6+}/Mo^{4+}) giving rise the corresponding ester: $R-COO^- + 4MoO_2 \rightarrow (R-COO)_4 Mo$.

This research is a part of the BRITE contract num. RI1-0279-C of the European Community and of the programme num. 6023 of the Institut d'Estudis Catalans, Barcelona.



PREPARACION, MICROESTRUCTURA Y CRISTALIZACION DE ALEACIONES DEL SISTEMA Nd-Fe-B OBTENIDAS POR SOLIDIFICACION RAPIDA.⁽¹⁾

A. Diego, M.D. Baró, S.Suriñach, N. Clavaguera* y M.T. Clavaguera-Mora

Física de Materials, Dep. Física, Univ. Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra.

* Dep. Estructura i Constituents de la Matèria, Fac. Física, Univ. Barcelona, Diagonal 647, 08028 Barcelona.

Introducción: Las aleaciones basadas en el compuesto Nd₂Fe₁₄B₁ (ϕ), y la relación entre microestructura y propiedades magnéticas, han despertado últimamente un notable interés. Dos son las rutas empleadas en la obtención de la aleación con la microestructura adecuada; el empleo de las técnicas adicionales de la pulvimetalurgia, así como la obtención del material microcristalino mediante técnicas de solidificación rápida (TSR). El empleo de las T.S.R. abre una nueva ruta consistente en la recristalización del material obtenido en estado amorfo. De esta forma es posible, en principio, "diseñar" la microestructura deseada en el material mediante tratamientos térmicos. En el presente trabajo se describe la influencia de los parámetros de preparación en la microestructura del material recién preparado, así como la microestructura obtenida en la cristalización del material amorfo.

Material y métodos: Se han preparado diversas aleaciones del sistema Nd-Fe-B por la técnica de la rueda fría ("melt spinning") con velocidades de rueda entre 12 y 37 m/s. El estudio de la microestructura de las aleaciones iniciales, así como la del material rápidamente enfriado se ha llevado a cabo mediante técnicas de microscopía electrónica (TEM, SEM), óptica (OM) y difracción de rayos X. La obtención mediante técnicas calorimétricas (DSC) de los parámetros de la cinética de cristalización ha permitido realizar tratamientos térmicos controlados en el calorímetro. Las técnicas de microscopía electrónica (TEM, SEM) han mostrado ser las más adecuadas para el estudio de la finísima microestructura que presentan estos materiales.

Resultados y discusión: Las técnicas de solidificación rápida (TSR) presentan una alternativa adecuada a las técnicas tradicionales de cristalización en la obtención de aleaciones de Nd-Fe-B. Es posible por este modo obtener la aleación directamente microcristalina, siendo ésta mucho más resistente a la corrosión que el material preparado por sinterización. La preparación del material por esta técnica presenta sin embargo cierta dificultad debido a la relativa inestabilidad del proceso de solidificación.

Las aleaciones preparadas de este sistema se presentan en la tabla I. Las experiencias realizadas muestran que es posible obtener las aleaciones #3 y #4 en estado amorfo para velocidades de rueda $V_r \geq 37$ m/s, mientras que las #1 y #5 presentan un pequeño grado de cristalinidad. A V_r inferiores, la velocidad de enfriamiento resulta mucho más crítica produciendo, cualquier inestabilidad del proceso, partes del material poco homogéneas (coexistencia de material amorfo y cristales de fase ϕ (fig. 1)). Mediante la

Trabajo subvencionado por EURAM CEE: MAIE.0061.C(H) y CICYT MAT90-0454

cristalización del material desde el estado amorfo, es posible sin embargo evitar este hecho, pudiéndose obtener diferentes microestructuras más homogéneas en función de la aleación y del tratamiento (fig. 2, 3).

El estudio de la cristalización del material amorfo mediante técnicas calorimétricas (DSC) ha permitido evaluar las energías de activación implicadas en los diferentes procesos que se presentan. En la tabla I se recogen estos valores evaluados mediante el método del pico. Conjuntamente la observación mediante TEM y dif. de rayos X de muestras parcialmente cristalizadas permiten establecer los mecanismos de cristalización controlados por la nucleación y el crecimiento de la fase ϕ (fig. 3). Las experiencias de difracción de rayos X muestran asimismo la cristalización de parte del material en αFe (aleaciones #1, #2 y #3). En la cristalización de #4 se forma Fe_3B metaestable (como fase principal) junto con ϕ y αFe .

Tabla I. (cristalización) Aleación	1 ^{er} pico E(eV)	2 ^o pico E(eV)	3 ^{er} pico E(eV)	4 ^o pico E(eV)
(#1) Nd ₁₃ Fe _{82.2} B _{4.8}	2.99			
(#2) Nd ₁₃ Fe ₇₉ B ₈	3.21	3.65	4.73	5.18
(#3) Nd _{8.5} Fe _{80.5} B ₁₁	4.54			
(#4) Nd ₃ Fe ₇₇ B ₂₀	5.91		3.95	
(#5) Nd ₁₆ Fe ₇₆ B ₈				

Bibliografía:- "Crystallization behaviour of some melt spun Nd-Fe-B alloys". M.T.Clavaguera-Mora, M.D.Baró, et. al., J.Mat.Res.5(1990),1201.
 - "Magnetization versus heat treatment in rapidly solidified NdFeB alloys". M.T.Clavaguera-Mora, M.D.Baró, et. al., IEEE Trans. Magn. (in press).
 - "Effects of quench rate on the texture in melt-spun Nd-Fe-B alloys". A.Zaluska, Yan Xu, et. al., Rapidly Quenched Met 7. Stockholm 1990.
 - "On the relation between microstructure, Heat treatment and coercivity in melt spun Nd-Fe-B alloys". M.D.Baró, S.Surinach, et. al., Proc. 6 int Symp. on Magn. Anisotropy and Coercivity (ed. S.G.Sankar, Carnegie Mellon Univ., Pittsburg 1990), p 357.

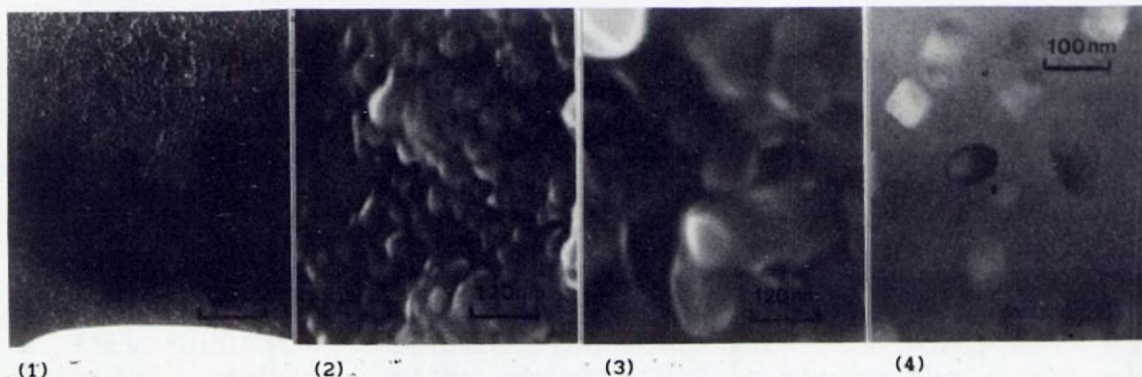


Fig. (1)-Irregularidades en #2 recién preparada ($V_r=20$ m/s). (2)-Aleación #4(am.), tras 15 min. a 1000K. (3)-Aleación #5(am.), tras 15 min. a 950K. (4)-Aleación #2(am.), tras 30 min. a 810K.

TIPOS DE MICROESTRUCTURA OBSERVADAS EN ALEACIONES DE Fe-Co-B-(Si,Nb) OBTENIDAS POR SOLIDIFICACION RAPIDA. (1)

J.A. Diego, S.Surifñach, M.D. Baró, N. Clavaguera* y M.T. Clavaguera-Mora

Física de Materials, Dep. Física, Univ. Autònoma de Barcelona,
08193 Bellaterra.

*Dep. Estructura i Constituents de la Matèria, Fac. Física,
Univ. Barcelona, Diagonal 647, 08028 Barcelona.

Introducción: El desarrollo de las técnicas de solidificación rápida y su empleo en la preparación de nuevas aleaciones y microestructuras, ha abierto un fascinante campo en la ciencia de los materiales que cataliza, hoy en día, el trabajo de muchos científicos. Si bien uno de los aspectos que más interés han despertado es la obtención y estudio del material en estado amorfo, dependiendo de las condiciones empleadas durante el proceso de solidificación podremos obtener también directamente el material cristalino o parcialmente cristalino. Es posible conseguir de esta forma todo un nuevo tipo de microestructuras en función de la composición y las condiciones de solidificación empleadas. En el presente trabajo trataremos de describir algunas microestructuras que se obtienen al enfriar rápidamente aleaciones del sistema Fe-Co-B-(Si,Nb).

Material y métodos: Las aleaciones fueron preparadas por "Vacuumschmelze mbH" mediante la técnica de "Planar Flow Casting", obteniéndose lingotas, algunas de ellas parcialmente cristalinas, de 1 a 2 cm de anchura y de 20 a 35 μm de espesor. La microestructura del material recién preparado se ha estudiado mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y difracción de rayos X. Se ha realizado asimismo un estudio de la cristalización de la fracción amorfa en coexistencia con los cristales preexistentes; cinéticamente mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) y microestructuralmente mediante microscopía electrónica (TEM) y difracción de rayos X. Las observaciones microscópicas se han realizado en muestras adelgazadas previamente mediante pulido electrolítico y/o por bombardeo iónico.

Resultados y discusión: Las diferentes microestructuras que pueden obtenerse por solidificación rápida dependerán de la composición de la aleación así como de la velocidad de enfriamiento. En general podremos agrupar las diferentes microestructuras en: *columnares o de interfase plana, celulares y dendríticas*, y *eutécticas*. La presencia de uno u otro tipo dependerá en general de la nucleación de los cristales, el número de fases que cristalizan (y los procesos de microsegregación asociados), y las condiciones de enfriamiento empleadas. Las aleaciones estudiadas se presentan en la tabla I, y en ellas se han observado varios tipos de microestructuras (Fig 1): celulares, dendríticas y eutécticas, coexistiendo todas ellas con el material en estado amorfo.

Al calentar las muestras puede detectarse dos o tres picos de

1) Trabajo subvencionado por CICYT MAT88-0314 y CIRIT [AR/89] a J.A.D.

Tabla I
Resultados térmicos y cinéticos

Aleación	1 pico		2 pico		3 pico	
	T(K)	Ea(eV)	T(K)	Ea(eV)	T(K)	Ea(eV)
(#a)Fe67Co15B18	722	2.3	752	3.4	768	3.4
(#b)Fe67Co15Si2B16	724	2.5			797	3.7
(#c)Fe68Co15Si1B16	698	2.3			821	4.1
(#d)Fe68Co15B17	705	2.5			767	3.3
(#e)Fe69Co15B16	681	2.6			767	3.4
(#f)Fe67.5Co15B16Nb1.5	699	2.6			820	4.1
(A18)Fe65Co18Si1B16	725	2.7			789	4.1
(C18)Fe65Co18Si1B16	704	2.6			796	4.3

cristalización. En la tabla I se presentan las temperaturas de pico obtenidas, en función de su composición, al calentar la muestra a una velocidad de 10K/min. Dado que los picos de cristalización se solapaban para varias muestras, hemos evaluado la energía de activación por el método de pico. Los valores obtenidos se encuentran así mismo en la tabla I. Los resultados de difracción de rayos X y TEM muestran que la cristalización tiene lugar independientemente de los cristales preexistentes (no tiene lugar en la interfase) mediante la cristalización primaria de $\alpha(\text{Fe,Co})$ seguida de la cristalización eutéctica de $\alpha(\text{Fe,Co})$ y $(\text{Fe,Co})_3\text{B}$.

Bibliografía:

- 1) W.J. Boettinger, Mater. Sci. & Eng. **98** (1988) 123-130.
- 2) M.D. Baró, S. Surinach, J.A. Diego, M.T. Clavaguera-Mora y N. Clavaguera, Mater. Sci. & Eng. (1990) in press.
- 3) S. Surinach, M.D. Baró, J.A. Diego, M.T. Clavaguera-Mora y N. Clavaguera, Key Eng. Mater., **40 & 41** (1990) 125-130.
- 4) M.D. Baró, J.A. Diego, N. Clavaguera y S. Surinach, Anal. Fis. (1990) in press.

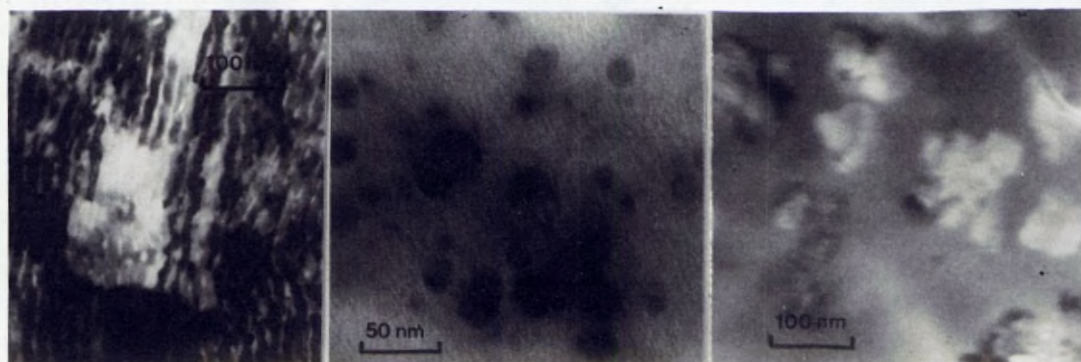


Fig 1.-Diferentes tipos de microestructura observadas en las aleaciones recién preparadas adelgazadas electrolíticamente. a) Tipo eutéctico aleaciones #a, #b y #e, b) Tipo celular aleación #d, c) Tipo dendrítico aleación #c.

ESTUDIO ANALITICO POR MICROSONDA ELECTRONICA DE LOS
PIGMENTOS DE LA TABLA DEL JUICIO FINAL ATRIBUIDA A
VAN DER STOCK

M.T. Doménech Carbó*, J.V. Gimeno Adelantado,

V. Peris.Martinez y F. Bosch Reig.

Departamento de Química Analítica, Fac. Química.

Sección Departamental de Conservación y Restauración*.

Universitat de València. Universidad Politécnica
de Valencia*.

Introducción: Entre las piezas más interesantes de la colección pictórica municipal de Valencia se encuentra la Tabla del Juicio Final atribuida al pintor flamenco Van der Stock (Bruselas, 1420-1495). Las inadecuadas condiciones térmicas e higroscópicas en las salas donde ha estado ubicada en los últimos años, han incidido negativamente en su conservación, y la Tabla necesita una inminente restauración. Esta tarea ha sido iniciada por la Sección de Restauración de la Facultad de Bellas Artes.

En la presente comunicación se muestran los resultados obtenidos en el examen analítico por Microsonda Electrónica de varias muestras de dicha Tabla.

Material y Métodos:

Se ha efectuado la toma de cuatro muestras mediante bisturí (1): rojo del manto de Jesucristo, marrón-negro de la túnica de un personaje, azul del cielo y dorado de los ornamentos del contorno. Cada muestra contenía todo el conjunto de capa protectora, película pictórica y preparación que mediante el tratamiento (2) habitual fueron montadas sobre soporte de latón y sometidas a un proceso de sombreado con oro excepto la muestra de dorado. Las imágenes han sido obtenidas con los equipos del Servicio de Microscopía Electrónica de la Universitat de València.

Resultados y Discusión: El examen en superficie en las tres muestras de color aparece dificultado por la gruesa capa protectora de barniz resinoso, impidiendo hacer un estudio de la distribución granulométrica de los pigmentos de la capa pictórica subyacente.

La muestra dorada en sección transversal presenta para la capa pictórica señal de calcio y una intensa señal de oro. Este resultado permite afirmar que en los dorados de esta Tabla se utilizó oro.

En la muestra roja se obtuvo señal significativa de azufre, calcio y plata (este último probablemente procede del adhesivo utilizado para fijar la muestra al soporte.

También se aprecia señal de silicio, hierro, cinc y una débil señal de cobre. Estos resultados indicarian que en esta zona de la Tabla se utilizó un pigmento a base de óxidos de hierro (rojo inglés, minio de hierro) acompañado de pequeñas cantidades de otros materiales como arena silícea.

La película pictórica de la muestra azul presenta señal de azufre, calcio, cobre y cinc. En este caso cabría pensar que el pigmento utilizado fué un azul a base de cobre. (azul de montaña, azul de Bremen).

En la muestra marrón-negra se obtuvo señal de carbono, azufre y calcio. Se inferiría de este resultado que en esta zona de la Tabla el autor utilizó un negro carbón.

La señal de azufre y calcio que aparece en todas las muestras corresponde con toda probabilidad a la preparación de yeso utilizada habitualmente en este tipo de obras. La señal de cinc que también se obtiene en las cuatro muestras probablemente esté causada por el soporte.

Bibliografía

- (1).HANLAN, J.; ICOM Committee for Conservation, 4th triennial Meeting. Venice, 1975, 75/4/3.
- (2).BIRKETT, H.G. and ROONEY, J.; Pigment and Resin Technology. 6 (1977), 14-18.

INFORMACION Y APLICACIONES DE LAS IMAGENES DE LA M.E. DE BARRIDO CON ELECTRONES RETRODISPERSADOS (ER).

R.Fontarnau, C.Carulla, R.Bargallo.

Servicios Científico-Técnicos.

Universidad de Barcelona.

Introducción: Cada vez es más amplio el uso de imágenes con ER dada la multiplicidad de aplicaciones en los distintos campos de la microscopía electrónica y a la rapidez en la obtención de la información. Esta aportación pretende ser una breve glosa multidisciplinaria en este sentido, mostrando las diversas posibilidades de estudio en microscopía de barrido desde una perspectiva técnica.

Materiales y Métodos: Se han obtenido imágenes de materiales tanto orgánicos como inorgánicos previamente preparados por los métodos convencionales para microscopía electrónica de barrido y recubiertos con carbón. Las observaciones se han llevado a cabo en un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM 840 equipado con un detector de estado sólido y en otro Hitachi S-2300 con un detector Robinson.

Resultados y Discusión: Por su alta energía los ER permiten la observación de estructuras poco conductoras obviando la carga electrostática.

Conocido es que la intensidad de retrodispersión es directamente proporcional a la densidad, Z medio, de la zona observada. Este contraste Z permite estudios tan dispares como: la valoración de capas finas, observar la difusión de elementos en matrices diversas, localización de partículas, detección de arcajes y estructuras internas, estudio de cortes histológicos, detección de discontinuidades, visualización de dominios magnéticos, estructuras cristalinas, etc.

Como ejemplo de lo dicho, la fig. 1 se trata de un plano pulido de columbotantalita en el que se aprecia zonación alterna de términos ricos en Nb (oscuro) y Ta (más claro), siendo

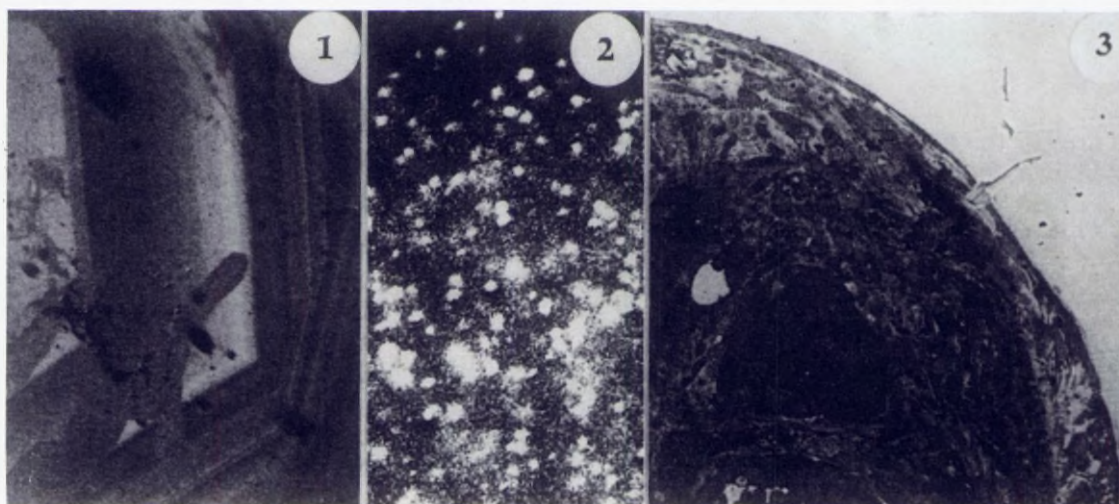
destacable la resolución del gradiente Z (Material suministrado por el Dr. J.C.Melgarejo, Dpto. Mineralogía, U. de Barcelona). La fig. 2 es un detalle a 3.500 aumentos de una fibra polimérica que contiene acúmulos de titanio en su seno; los ER ponen de manifiesto el metal como puntos brillantes. (Material cedido por Rhône-Poulenc Fibras S.A.). En la fig. 3 se observa un corte de planaria en estado de regeneración de 2 micras de espesor, con señal invertida, con una resolución superior a la del microscopio óptico y de una extensión mayor que la que permite el M.E. de transmisión. (Especimen proporcionado por la Dra. M. Ribas, Dpto. Genética, U. de Barcelona).

En otro sentido, las irregularidades superficiales del objeto que se estudia definen en el espacio las trayectorias de los ER, abriendo un amplio abanico de posibilidades para estudios microtopográficos. La adecuada estrategia geométrica de los detectores, o la combinación entre ellos, permite la obtención de diversas perspectivas de una misma imagen.

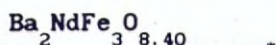
Bibliografía:

P.J.Goodhew, F.J. Humphreys, "Electron Microscopy and Analysis" Taylor and Francis, Ed., 1988.

J.I.Goldstein, D.E.Newbury, P.Echlin, D.C.Joy, Ch.Fiori, E. Lifshin. "Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis". Plenum Press, 1984.



Estudio por Microscopía electrónica de alta resolución de



E. García, M. Parras, M.J. Sayagués, M. Vallet* y J.M. González Calbet.

Dpto. Química Inorgánica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense, 28040-Madrid.

* Dpto. Química Inorgánica y Bioinorgánica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. 28040-Madrid.

Introducción: Diferentes estudios en materiales $\text{A}_2\text{Fe}_2\text{O}_5$ con estructura derivada de la perovskita, han puesto en evidencia que el catión que ocupa la posición A afecta en gran medida a la coordinación del hierro. El hierro presenta coordinación octaédrica y tetraédrica en el material $\text{Ca}_2\text{Fe}_2\text{O}_5$ (1) y, además, se encuentra también en un entorno piramidal en el $\text{Ba}_2\text{Fe}_2\text{O}_5$ (2). Por otra parte, el estudio de las variaciones de composición en el sistema $\text{LaFeO}_3\text{-Ca}_2\text{Fe}_2\text{O}_5$ (3) ha puesto de manifiesto la presencia de una fase ordenada $\text{Ca}_2\text{LaFe}_3\text{O}_8$ formada por dos capas de octaedros que alternan con una capa de tetraedros según el eje c.

Material y Métodos:

Sobre la base de estas ideas, hemos preparado (reacción en estado sólido a 1300°C durante 48 horas) el material $\text{Ba}_2\text{NdFe}_3\text{O}_{8.40}$, con la misma composición catiónica que el anteriormente descrito, con objeto de estudiar la influencia en la coordinación del hierro de los cationes que ocupan la posición A de la perovskita.

El estudio por difracción de electrones y microscopía electrónica se realizó en un microscopio electrónico JEOL 4000 EX.

Resultados y Discusión:

El diagrama de difracción de rayos X puede asignarse a una fase de simetría cúbica correspondiente al tipo estructural perovskita con parámetro $a = 3.9 \text{ \AA}$, sin que se observen máximos de superestructura que indiquen la presencia de orden de las vacantes aniónicas en este material. Sin embargo, como quiera que el porcentaje de dichas vacantes por celda unidad es aproximadamente del 6.6 %, puede esperarse un orden local de las mismas. Efectivamente, los diagramas de difracción de electrones (DDE) a lo largo de los ejes $[100]$ y $[1\bar{1}0]$ indican la presencia de una superestructura de orden 5 a lo largo del eje c y pueden asignarse a una celda de parámetros $a \times a \times 5a$ siendo a el parámetro de la subcelda perovskita.

La imagen de alta resolución (IAR) a lo largo de $[1\bar{1}0]$ (fig. 1) muestra un material aparentemente ordenado que permite proponer un modelo estructural en el que capas de octaedros alternan con capas de pirámides de base cuadrada en la secuencia ...OPOOP..., en perfecto acuerdo con la cantidad de oxígeno determinada por análisis químico. Si todas las vacantes aniónicas estuvieran ordenadas, se obtendría una estructura con parámetros $2a \times a \times 5a$ que no estaría de acuerdo con los diagramas de difracción observados. Para justificar la ausencia de superestructura en la dirección del eje a , es necesario suponer un desorden de las vacantes aniónicas en los planos (001) de acuerdo con el modelo estructural de la fig. 2.

Bibliografía

- (1) J.C. Grenier, L. Fournes, M. Pouchard, P. Hagemuller y S. Komornicki, *Mat. Res. Bull.*, **17**, 55 (1982).
- (2) M. Parras, L. Fournes, J.C. Grenier, M. Pouchard, M. Vallet Regí, J.M. González Calbet y P. Hagemuller, *J. Solid State Chem.*, **88**, 261 (1990).
- (3) J.C. Grenier, J. Darriet, M. Pouchard y P. Hagemuller, *Mat. Res. Bull.*, **11**, 1219 (1976).

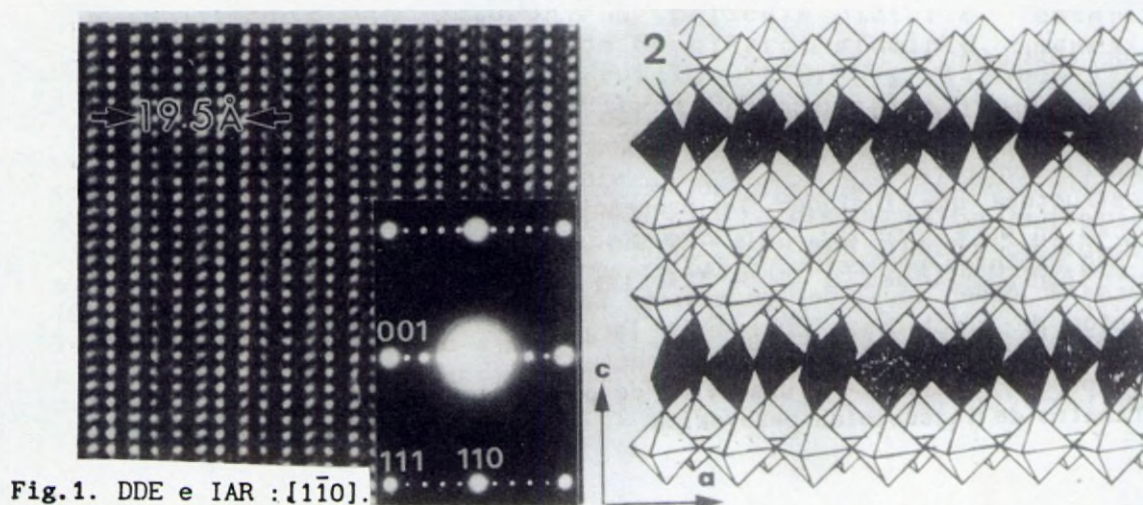


Fig.1. DDE e IAR : $[1\bar{1}0]$.

MICROANÁLISIS SEM-EDS DE INCLUSIONES FLUIDAS EN HALITA

García Veigas,¹J.; Ayora,²C.; Pueyo,¹J.J. y Fontarnau,³R.

1-LIFS, Dpto. Geoquímica, Fac. Geología, BARCELONA

2-Instituto de Geología "Jaume Almera", CSIC, BARCELONA

3-Servicios Científico-Técnicos, Uni. Barcelona, BARCELONA

Introducción: Durante su crecimiento, los cristales de halita atrapan pequeñas cantidades de salmuera donde están inmersos en forma de inclusiones fluidas. Su estudio es de gran importancia ya que contienen información sobre la composición de la salmuera y sobre las condiciones en el momento de la precipitación mineral. Las inclusiones fluidas en cristales de halita se presentan como cavidades cúbicas de tamaño generalmente inferior a $1000 \mu\text{m}^3$. El análisis de los fluidos que contienen únicamente puede realizarse por técnicas microscópicas.

Material y Métodos: Los análisis se han realizado en un SEM JSM-840 JEOL dotado con un detector EDS (AN 10000, LINK Analytical) y un portamuestras criogénico diseñado por JEOL. Las condiciones de análisis han sido de 15 kV de voltaje de aceleración y 1.5 nA de intensidad de corriente de sonda.

Un fragmento de mineral es congelado por inmersión en nitrógeno líquido junto a gotas de soluciones de concentraciones conocidas, e introducido posteriormente en la precámara criogénica donde es fracturado y metalizado con aluminio.

Resultados y Discusión: La técnica de microanálisis SEM-EDS de especímenes congelados ha sido clásicamente aplicada a muestras biológicas (MARSHAL 1988). KELLY y BURGIO (1983) la aplican, por primera vez, al estudio de inclusiones fluidas en muestras minerales, y recientemente ha sido desarrollada por AYORA y FONTARNAU (1989).

El cálculo de concentraciones se ha realizado por interpolación con rectas de calibrado de las relaciones pico/fondo obtenidas del análisis de las soluciones de referencia. Con el propósito de minorizar los efectos de interferencia y absorción se han utilizado patrones de concentraciones multielementales (Cl, SO_4 , Na, Mg y K) similares a las obtenidas para las inclusiones fluidas.

El principal problema analítico consiste en eliminar los efectos de carga electrostática generados por el hielo. Para ello, muestra y patrones son metalizados, en el interior de la precámara, evaporando un filamento de aluminio.

La homogeneidad en la relación pico/fondo para las soluciones patrón muestra desviaciones standar inferiores al 5%, y son debidas principalmente a la rugosidad de la superficie de las gotas congeladas. Este valor es inferior en las inclusiones fluidas.

Los límites de detección establecidos son del 1.5% para el sodio, del 1% para el magnesio, del 0.5% para el sulfato y del 0.1% para el cloro, potasio y calcio.

El análisis de inclusiones fluidas en diferentes muestras de halita nos permite establecer variaciones en la composición original de las salmueras durante diferentes procesos geológicos.

Bibliografía: AYORA, C. y FONTARNAU, R. (1989).- X-Ray Microanalysis of frozen Fluid inclusions al -140°C . (Abstr.) ECROFI, London.

KELLY, W. y BURGIO, P. (1983).- Cryogenic scanning electron microscopy of fluid inclusions in ore gangue minerals. Economic Geology, nº 78, 1262-1267.

MARSHAL, A. (1988).- Progress in quantitative X-ray microanalysis of frozen-hidrated bulk biological samples. Jour. Elec. Micr. Tech. nº 9, 57-64.

XAMEN ANALITICO POR MICROSONDA ELECTRONICA DE PIGMENTOS DE LA DECORACION MURAL DE INTERIORES DEL PALACIO DEL MARQUES DE DOS AGUAS (VALENCIA)

.V. Gimeno Adelantado, M.T. Doménech Carbó*,
. Peris Martinez y F. Bosch Reig.
Departamento de Química Analítica, Fac. Química
Sección Departamental de Conservación y Restauración*,
Universitat de València. Universidad Politécnica
de Valencia*.

roducción: El Palacio del Marqués de Dos Aguas de Valencia se construyó sobre una edificación antigua y se reedificó en 1970 época de la que data su magnífica portada de J.Vergara.

En 1970 fué restaurado por la Diputación General de Arquitectura y recientemente se han iniciado obras para restaurar algunas estancias (salón de Baile, vestibulo, etc.). En el presente estudio se presentan los primeros resultados del análisis de muestras de las pinturas murales del salón de baile mediante MEB/EDX. Se sistematiza el tratamiento y examen de este tipo de muestras y se discute la información que esta técnica es capaz de aportar para el completo análisis y caracterización de una obra pictórica.

aterial y Métodos:

Se tomaron muestras del muro y pilares de la sala de Baile que correspondían a la capa externa verde y una tercera muestra que correspondía a una capa azul subyacente a la verde. Se efectúa un examen en superficie de la película pictórica y un segundo examen en sección transversal. Las muestras una vez preparadas adecuadamente se montan sobre un soporte de carbono mediante cinta adhesiva (1-2). Se han obtenido imágenes con electrones secundarios y retrodispersados en El Servicio de Microscopía Electrónica de la Universitat de València.

Resultados y Discusión:

El examen en superficie muestra una estructura de la capa de pigmento verde con una gran homogeneidad en la distribución y tamaño de las partículas de pigmento. En la muestra azul la distribución es más heterogénea. En sección transversal en la muestra verde se observa la existencia de siete capas morfológicamente diferenciadas y dos en la azul. Se ha llevado a cabo un tratamiento de imagen que ha permitido obtener el espesor de cada capa. La segunda muestra verde presenta características similares a la anterior.

Interpretación de resultados

Los resultados obtenidos para las muestras verde hacen suponer que se emplearon para su elaboración el mismo procedimiento y materiales. En ambas se dispondría una capa

inferior integrada por yeso, probablemente mezclado con materiales de tipo arcilloso y arena silíceo. Sobre ella se encuentra distribuida en cuatro capas diferenciadas en la composición de los diversos compuestos que la forman una imprimación probablemente de litopón (70% de sulfato de bario + 30% de sulfuro de cinc). La inferior con abundancia de yeso y muy poco litopón, dos capas intermedias en las que decrecería el contenido en yeso y con elevado contenido en sulfuro de cinc y la capa superior constituida casi exclusivamente por litopón. La película pictórica estaría constituida por hidrosilicatos de hierro, aluminio, magnesio y potasio (tierra verde), rutilo (TiO_2) y litopón. Se encuentran también aquí dos capas, la externa con mayor concentración de pigmentos y la interna con mayor concentración de litopón.

En la muestra azul, la capa de preparación estaría constituida por carbonato cálcico. La capa pictórica puede suponerse constituida por litopón y como pigmento cromóforo azul ultramar.

Bibliografía

- (1).ZORLL, U., Defazet; 32 (1978), 118-122.
- (2).NOLAN, P.J. and KEELEY, R.H.; Scanning Electron Microscopy, I (1979), 449-454.

a)



b)



Figura 1.- Microfotografías obtenidas mediante la señal de retrodispersados utilizando detector de Robinson. a) muestra verde b) muestra azul.

DESGASTE POR ABRASION DE BOLAS DE ALUMINA. RELACION CON SU MICROESTRUCTURA.

Gozalbo, A.; Orts, M.J.; Picó, M.

Instituto de Tecnología Cerámica de la Universitat
de Valencia.

Asociación de Investigación de las Industrias Cerámicas. Castellón

Introducción:

La molienda de materias primas en forma de suspensión es una de las etapas más comunes de la fabricación de materiales cerámicos. Dicha operación se efectúa habitualmente en molinos de bolas en los que estos materiales sufren un desgaste continuo por abrasión.

En este trabajo se ha tratado de relacionar el desgaste por abrasión de tres tipos de bolas de alúmina, utilizadas en la industria, con su microestructura.

Material y Métodos:

Se han efectuado ensayos de abrasión profunda en tres tipos de bolas de alúmina de baja porosidad siguiendo el método descrito en la norma UNE 67-102-85 (1). Posteriormente se prepararon probetas de la superficie y del interior de las bolas y se observaron con un microscopio electrónico de barrido (MEB).

Resultados y Discusión:

Los resultados de la abrasión profunda (Figura 1) mostraron que la bola A se desgastaba a mayor velocidad que B y C. Estas últimas se abrasionaban con la misma velocidad aunque la bola C experimentaba un mayor desgaste inicial. Por MEB se observaron diferencias microestructurales, tanto en la superficie como en el interior, entre las diferentes bolas que permitieron interpretar su diferente comportamiento frente a la abrasión. En efecto, la bola A presentaba granos de corindón de 5-7 μm embebidos en una fase vítrea mientras que no se observó fase vítrea en las bolas B y C. En lo que respecta a la superficie externa, las bolas A y B presentaban una superficie lisa con poros de diferente tamaño mientras que en la bola C, que presentaba un mayor desgaste inicial, se observaban los gránulos de atomizado utilizados en la conformación de la pieza, ligeramente deformados.

Se ha comprobado que la velocidad de desgaste por abrasión es tanto mayor cuanto mayor es el contenido en fase vítrea (de menor dureza que el corindón) y mayor es el tamaño de grano del corindón.

El desgaste inicial de estas bolas de alúmina está relacionado con la presencia de heterogeneidades en la superficie de las mismas (aglomerados y poros de gran tamaño) originados durante su conformación.

Bibliografía:

- (1) UNE 67-102-85. Asociación Española de Normalización y Certificación. Madrid.

Figura 1.- Cinética de abrasión de los tres tipos de bolas.

Figuras 2 a 7.- Microestructura de la superficie y del interior de las tres bolas de alúmina.

APARICION DE NUCLEOS DE MARTENSITA γ' INDUCIDA POR TENSION EN UN MONOCRISTAL β Cu-20.85Zn-6.15Al CON MEMORIA DE FORMA.

J.M. Guilemany y F.J. Gil⁺

Metalurgia. Facultad de Química. Universidad de Barcelona.

⁺Ciencia de Materiales e Ing. Metalúrgica. ETSIB. U.P.C.

Introducción:

En este trabajo, se ha observado la presencia de núcleos de martensita γ' inducidos por tensión a partir de martensita β' . Para ello, se ha elaborado mediante el método de Bridgman (1), un monocristal de composición química en peso de 20.85% Zn y 6.15% Al, con una concentración electrónica de 1.46. La orientación cristalina fue determinada por el método de Laue, resultando ser la (111). Las temperaturas de transformación fueron determinadas mediante un calorímetro de flujo multicélula (2), siendo $T_S = -6^\circ\text{C}$, $M_f = -22^\circ\text{C}$, $A_S = -18^\circ\text{C}$ y $A_f = 12^\circ\text{C}$.

Material y Métodos:

Se toma una muestra cilíndrica de 4mm de altura y 6.5mm de diámetro, sometiéndola a ensayos de compresión, con una máquina Hounsfield W., a temperatura ambiente y a una velocidad de 10 MPa/s, produciéndose a la tensión de 14 MPa la transformación $\beta \rightarrow$ martensita inducida β' (9R) de estructura romboédrica, y retransforma a la fase β a 50 MPa.

Se realizan ciclos sucesivos de carga-descarga a 250 MPa, es decir son ciclos en los que se producen transformación-retransformación ya que la tensión aplicada es superior a la crítica. A diferentes números de ciclos (40, 100 y 200) se observa la muestra en un microscopio electrónico de barrido.

Resultados y Discusión:

Se aprecia como las placas martensíticas se acomodan a unas orientaciones referentes, como se muestra en la figura 1 (SEMx1000), 2 (SEMx2000) y 3 (SEMx5000). También se aprecia que a medida que se aumenta el número de ciclos, aparece mayor cantidad de martensita estabilizada, esto es debido a que al aplicar tensión, se crean defectos, principalmente dislocaciones, que anclan las placas martensíticas, obstaculizando su retransformación.

La irregularidad del trazado de las placas a nivel superficial da idea de la tensión acumulada ciclo a ciclo; si se continua aplicando más tensión, estas placas finas van creciendo unas a expensas de otras, produciendo placas de mayor grosor y con orientaciones preferentes.

A 200 ciclos se observa la aparición de pequeños núcleos de martensita δ' ricos en aluminio con estructura hexagonal (2H) con secuencias de apilamiento AB. Este tipo de martensita se sitúa en zonas de interconexión entre diferentes variantes martensíticas. Este hecho se debe a que son en estas zonas donde existe una mayor cantidad de energía elástica acumulada que favorece la transformación martensítica ($\beta' \rightarrow \delta'$) (3).

La muestra rompió frágilmente a 220 ciclos, debido a los núcleos δ' que actúan de exaltadores de tensiones.

AGRADECIMIENTOS.

Los autores agradecen a la CICYT la concesión del proyecto MAT 89-0407-C03-02 que ha sufragado en parte la realización de este trabajo.

Bibliografía:

- (1) F.J.Gil. Tesis Doctoral. Universidad Barcelona. (1989).
- (2) J.Muntasell, J.L.Tamarit, J.M.Guilemany, F.J.Gil y E.Cesari. Mat. Res.Bull. 24 (1989) 445-452.
- (3) T.Saburi y Y.Inada, S.Nenno y N.Hori. Journal Physique C4, 12 (1982) 633.

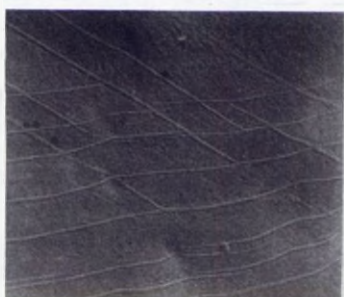


Fig.1 Estructura a 40 ciclos.(x1000)



Fig.2 Estructura a 100 ciclos.(x2000)

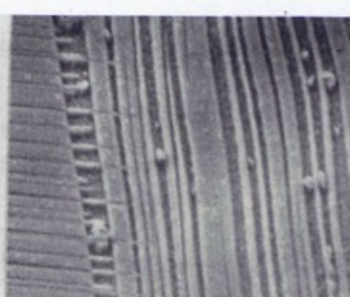


Fig.3 Estructura a 200 ciclos.(x5000).

COEXISTENCIA DE MARTENSITA α' Y β' EN ALEACIONES Cu-Zn-Al CON

MEMORIA DE FORMA.

J. Ma. Guilemany y F. J. Gil ⁺.

Metalurgia. Facultad de Química. Universidad de Barcelona.

Ciencia de los Materiales e Ing. Metalúrgica. E.T.S.I.I.B. U.P.C.

Introducción: Las estructuras martensíticas correspondientes a las aleaciones Cu-Zn-Al presentan principalmente, según su composición química, tres posibles estructuras cristalográficas: a) martensita α' romboédrica (3R) que tiene secuencia de apilamiento ABC y está maclada interiormente, apareciendo en aleaciones con poco contenido de aluminio. b) martensita β' romboédrica (9R) con una secuencia ABCBCACAB presentando cierta distorsión monoclinica respecto al apilamiento perfecto. c) martensita hexagonal δ' (2H) correspondiente a un apilamiento AB y se encuentra en aleaciones ricas en aluminio (1). Delaey y col. (2) determinaron que en el intervalo de concentraciones electrónicas (e/a) de 1.49 a 1.50 se produce el cambio de estructuras martensíticas de β' a δ' .

Material y Métodos: En este trabajo se determina el intervalo en que se produce la transición de α' a β' . Para ello se han elaborado, mediante fusión al vacío, 48 aleaciones con e/a desde 1.360 a 1.498. A estas muestras se les realiza un tratamiento térmico consistente en mantener a 850°C durante 10 min. y temple en agua. Se preparan metalográficamente y se observan en un microscopio electrónico de barrido ISI SS-60 con poder de resolución de 60 Å, siendo el potencial de aceleración de 20 KV, usando diferentes distancias de trabajo y con una apertura de lente objetivo de 80 µm. Se ha trabajado con electrones secundarios en superficie pulida con ataque profundo, lo que permite observar en detalle las diferencias morfológicas.

Resultados y Discusión:

Se observa que a concentraciones electrónicas inferiores a 1.42, la estructura martensítica corresponde a α' con sus maclas de gran tamaño que rompen las placas martensíticas como puede verse en la figura 1 (SEM x120) para una aleación con e/a = 1.410. Cuando la concentración electrónica está entre los valores de 1.42 y 1.45, las morfologías martensíticas α' y β' coexisten, observándose placas con grandes maclas típicas de martensita α' y placas más finas sin defectos propias de la martensita β' . Estas estructuras se pueden observar en la figura 2 (SEM x3600) correspondiente a una aleación con e/a = 1.427. A partir de concentraciones electrónicas de 1.45, la estructura martensítica es totalmente β' , como se aprecia en la figura 3 (SEM x1450) para una aleación con e/a = 1.481.

Al realizar estudios calorimétricos con A.T.D. (Análisis Térmico Diferencial) y D.S.C. (Differential Scanning Calorimeter) para la determinación de las temperaturas de transformación, se observa que las estructuras martensíticas α' no retransforman a β en las temperaturas de trabajo (20° a 600°C) y por tanto no sufren la transformación martensítica termoelástica y no tienen aplicación tecnológica como metales con memoria de forma.

A partir de la aparición de martensita β' se observan picos calorimétricos tanto de transformación ($\beta \rightarrow$ martensita) como de retransformación (martensita $\rightarrow \beta$) propias de una transformación martensítica termoelástica.

AGRADECIMIENTOS.

Los autores agradecen a la CICYT la concesión del proyecto MAT 89-0407-C03-02 que ha sufragado en parte la realización de este trabajo.

Bibliografía

- (1). L.Delaey, J.Derruyterre, E.Aernouft y J.Roos. INCRA Research Report, 238 (1978), 142-151.
- (2). L.Delaey y I.Cornelis. Acta Metallurgica 18 (1970) 1061-1065.



Fig.1 Martensita α'
(x 1200)



Fig.2 Coexistencia
de α' y β' (x 3600).

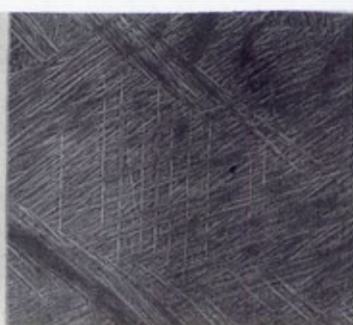


Fig.3 Martensita β'
(x 1450)

ESTUDIO EN TEM DEL PROCESO DINAMICO DE FORMACION DE PRECIPITADOS α Y γ EN UNA ALEACION Cu-Zn-Al-Co.

J. M. Guilemany, J. Fernández. F. Peregrin, J.R. Miguel.

Departamento de Metalurgia.

Facultad de Química. Universidad de Barcelona.

Introducción: Dado que la fase β y martensítica de las aleaciones base Cu son termodinámicamente metaestables con respecto a la estructura de equilibrio, la cual consiste en un estado bifásico α y γ , un calentamiento de la aleación provocará una precipitación de las fases que formen la estructura de equilibrio a esa temperatura (1-5).

El objetivo de este trabajo consiste en la observación "in situ" en TEM del fenómeno de precipitación de las fases α y γ , así como la caracterización de éstas.

Material y Métodos: Se ha utilizado una aleación Cu-Zn-Al-Co de e/a 1.468. Se han cortado muestras de 70 mm.x 5 mm.x 0.5 mm., las cuales han sido calentadas a 850°C durante 15 minutos templándose, posteriormente, en agua a temperatura ambiente. El tratamiento térmico de la martensita inducida ha sido llevado a cabo en un baño termostático de aceite a las temperaturas de 150° y 200°C, para cada una de las muestras ensayadas (6).

Se han cortado discos de 3 mm. de diámetro, los cuales han sido adelgazados por ion-thinning a 4 kV y a ángulos de 10° y 5°. La observación in situ se ha realizado en un TEM a 200 kV, dotado de portamuestras de calentamiento, que permite calentar la muestra hasta temperaturas de 850°C. Mediante un sistema de video se ha obtenido un registro dinámico de la transformación. Se han utilizado las técnicas de SEM, STEM y microanálisis EDS.

Resultados y Discusión:

La aleación presenta inicialmente un precipitado de Co, el cual se ha añadido como elemento afinador del tamaño de grano, uniformemente distribuido por la matriz y en el límite de grano, Figura 1.

Al calentar a 150°C la muestra educada a la temperatura de 150°C, en el interior del microscopio mediante el portamuestras de calentamiento, se observa la aparición de unos precipitados de forma lenticular.

Un estudio a mayores aumentos en SEM y STEM, nos permite distinguir dos tipos de precipitados, diferentes en tamaño, Figura 2. Se ha realizado un microanálisis EDS de cada uno de estos precipitados, observándose que los de mayor tamaño corresponden a fase α y los de menor tamaño a fase γ , más

rica en Al.

El calentamiento a 150°C de la muestra educada a la temperatura de 200°C, aparentemente presenta un comportamiento similar al anterior, observándose nuevamente la presencia de los dos precipitados α y η , siendo también en este caso, el primero mayor en tamaño que el segundo.

Particularidades de esta transformación son discutidas a través de un video con el que se acompaña este trabajo.

AGRADECIMIENTOS.

Los autores agradecen a la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) la concesión del proyecto MAT 89 -0407- C03 - 02 con el que se ha sufragado parte del trabajo.

Bibliografía

- (1) D.Schofield, A.D. Miodownik, Metals Technology, 167, (1980).
- (2) D.P.Dunne, N.F.Kennon, Metals Forum, vol. 4, nº 3, 176, (1981).
- (3) N.F.Kennon, D. P.Dunne, L.Middleton, Met. Trans., 13A, 551, (1982).
- (4) Eon-Sik Lee, Young G. Kim, Scripta Met., vol. 24, 745, (1990).
- (5) M. de Graef, J. Van Humbeeck, L. Delaey, Proceeds. Int. Conf. on Martensitic Transformations, ICOMAT-86, Nara (Japón), 850, (1986).
- (6) J. M. Guilemany, J. Fernández, B. G. Mellor, Scripta Met., vol. 24, 1941, (1990).

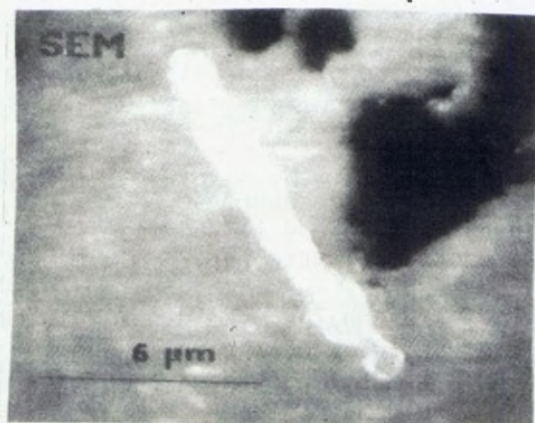


Figura 1. Precipitado de Co

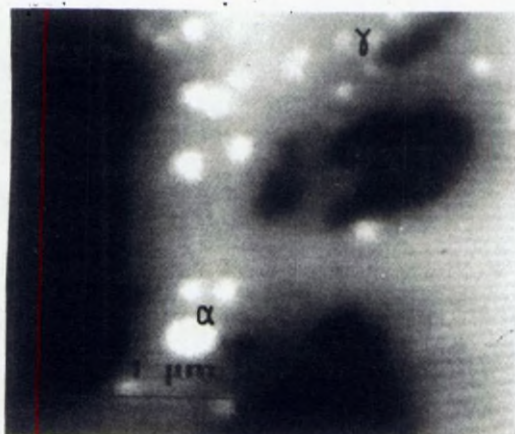


Figura 2. Precipitados de α y η

MORFOLOGÍAS AL SEM Y MICROANÁLISIS EDS DE RECUBRIMIENTOS SOBRE ALEACIONES LIGERAS DE CARBUROS DE WOLFRAMIO - TITANIO OBTENIDAS POR TÉCNICAS DE HIPERVELOCIDAD.

J. M^a. GULEMANY, N. LLORCA, J. GARCIA*, M^a. D. NUÑEZ**

Departamento de I.Q. y Metalúrgia

UNIVERSITAT DE BARCELONA - FACULTAT DE QUÍMICA - BARCELONA 08028

*PLASMATECHNIK AG (SUÍZA)

**PROJACIER SA (BARCELONA)

Introducción:

La proyección de cualquier material para recubrir a otro material base llamado sustrato sea cual sea el método usado debe evitar la descomposición del material a proyectar. Para el caso de los carburos, este problema existe y para evitarlo hay la posibilidad de recubrir el carburo con un metal y proyectarlo con la técnica de hipervelocidad, lo que permite su correcta proyección ya que el metal alcanzará la fusión y dará lugar a la buena unión entre partículas una vez proyectadas sobre el sustrato. En particular, éste es el caso de los carburos de Titanio - Wolframio del presente trabajo en los que la matriz que acompaña a dichos carburos es Níquel. El control de la morfología de los polvos de partida es muy importante para el resultado final de la capa proyectada. (1) (2)

Material y Métodos:

Para la realización de este trabajo se ha estudiado el polvo de partida consistente en partículas de (Ti,W)C recubiertas de Ni, el material sustrato fueron barras de Aluminio del 99,5 % de pureza sometidas a un proceso de chorreado manual con partículas de corindón de grado 30-35 para dar la rugosidad adecuada al sustrato, con el fin de facilitar la unión con el recubrimiento. La observación se realizó con microscopio electrónico de scanning ISI SS60 con poder de resolución de 60 Å dotado de un detector de electrones retrodifundidos (BSE) Robinson de elevado poder de resolución y un detector EDS de elementos ligeros. El potencial de trabajo fue de 15 kV. El análisis de imagen se realizó en equipo MVP-AT de Matrox Electronic Systems Ltd. instalado en un ordenador PC-AT empleando el software basado en el sistema SAMBA de TITN.

Resultados y Discusión:

Materia Prima.

En las imágenes en SEM se puede observar el polvo de (Ti,W)C-Ni. La figura 1 muestra a pocos aumentos el aspecto facetado de dichos polvos. No se aprecian grandes diferencias de tamaño, lo cual se verá confirmado posteriormente con el Análisis de imagen. A mayores aumentos observamos que la superficie del polvo, no es lisa sino que aparece recubierta totalmente por globulos que resultan ser de níquel. A pesar de recubrir totalmente las partículas de carburo de titanio y wolframio, se mantiene la forma facetada de estos polvos, por esta razón a menores aumentos no se aprecia una esferoidización del polvo. También se puede observar que el método seguido para recubrir estos carburos con Ni permite cubrir las partículas individualmente, es por ello que se hallan separadas al formar los polvos. Asimismo aparecen partículas de carburo que no se han recubierto por el metal. Cabe destacar también que se han detectado también algunas partículas individuales de carburo de titanio (TiC), si bien en muy escasa cantidad.

Para estudiar como se recubrían de níquel las partículas de carburo, se procedió a una pequeña molidura del polvo. En las figuras correspondientes se observa alguna partícula que presenta parte del níquel arrancado, mostrando la morfología del carburo.

Se realizaron microanálisis del polvo, obteniéndose que el carburo está formado exclusivamente por Ti, W y C en una relación de Ti:W de 25:75 aproximadamente y que el recubrimiento es Ni. Alguna partícula de óxido de wolframio ha sido también hallada.

Para estudiar la morfología de los polvos se procedió al análisis de imagen observándose que no hay mucha dispersión de tamaño y que los objetos se encuentran en el intervalo (μm) Dmax (25,40) y Dmin (12,25) lo que justifica también que el resultado del valor medio del parámetro morfológico FORM PE sea 0,68.

Aluminio Chorreado.

La rugosidad obtenida después del chorreado con corindón sobre el aluminio muestra un picado homogéneo de su superficie con buenos puntos de anclaje para el polvo proyectado.(figura Superficie Proyectada.

La morfología de la superficie libre que aparece en la figura 3, muestra que no hay grietas o defectos que podrían provocar una disminución de las propiedades del material, ni tampoco porosidad. Asimismo se aprecia que la capa exterior ha fluido, es decir el metal, en este caso níquel, presenta buena mojabilidad sobre los carburos del recubrimiento.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a la CICYT la concesión del proyecto MAT 90-0046-E para la realización de este trabajo.

Bibliografía

- 1.- J.Mª Guilemany, Mª. D. Núñez, J. García. Memorias de Plasma Spraying International Conference. vol. 11 Pergamon Press. (1988).
- 2.- J.Mª. Guilemany, Mª. D. Núñez, J. García. Revista Técnica Metalúrgica Enero-Febrero, nº 296, (1990) , 4.



FIGURA 1

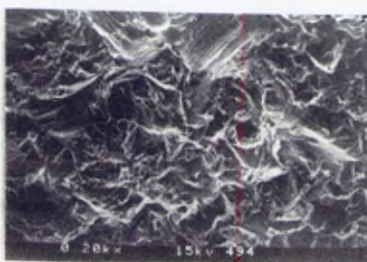


FIGURA 2

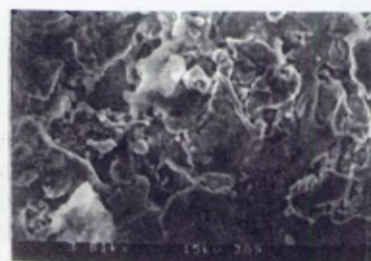


FIGURA 3

ESTUDIO MEDIANTE EXPERIMENTOS IN SITU EN TEM DE LA FORMACION DE PRECIPITADOS EN ALEACIONES CON MEMORIA DE FORMA Cu-Al-Mn

J.M. Guilemany, F. Peregrín, J. Fernández, J.R. Miguel.

Metal.lúrgia - Metal.lúrgia Física.

Fac. Químiques. Universitat de Barcelona. C/ Martí i Franqués s/n
08028 BARCELONA.

Introducción:

Las aleaciones Cu-Al-Mn presentan una transformación martensítica termoelástica que les confiere entre otras propiedades el efecto de memoria de forma, en un rango determinado de composición y temperaturas (1)(2). En competencia con la transformación martensítica existe la transformación de equilibrio con la aparición de fases α y γ según el diagrama de equilibrio (3), que dificultan o incluso inhiben la transformación martensítica. Este hecho es de gran importancia en las propiedades singulares de esta aleación dado que el ciclaje térmico puede provocar la aparición de estas fases, variando la composición de la fase β metaestable y con ello sus temperaturas características de transformación (4)(5).

Material y Métodos:

Se ha trabajado con dos aleaciones Cu-Al-Mn (Cu-11.1Al-5.4Mn con (e/a)=1.452 y otra Cu-9.85Al-4.4Mn con (e/a)=1.407) obtenidas por fusión en vacío y posterior refusión y colada. Se somete ambas muestras a un tratamiento térmico de temple desde 850°C para obtener la estructura metaestable. Se ha realizado un estudio dinámico en un equipo TEM HITACHI H-800 (videograbación-, trabajando a 200 kV y ciclando térmicamente las muestras mediante un portamuestras de calentamiento. Posteriormente se ha llevado a cabo un estudio mediante técnicas de STEM y SEM junto con un equipo de microanálisis EDS acoplado al mismo equipo. En la Figura 1 se muestra un esquema del dispositivo utilizado.

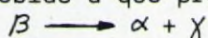
Resultados y Discusión:

La muestra 1 se ha ciclado entre 25°C y 150°C, observándose la aparición de precipitados, en la etapa de calentamiento, en diferentes zonas de la muestra. La imagen que se observa en la videograbación se ha realizado a 10000 aumentos, observándose una zona general de transformación -estructura martensítica 2H- con la aparición de unos pequeños precipitados. La muestra 2 se ha ciclado entre unos márgenes más amplios de temperatura, en concreto entre 25°C y 400°C, observándose -también a 10000 aumentos- una mayor aparición de precipitados en el seno de una martensita de estructura 18R .

El estudio mediante STEM y SEM, junto con el sistema de microanálisis acoplado, muestra la presencia de dos tipos diferentes de precipitados, tanto en naturaleza como morfología y tamaño. Los precipitados de mayor tamaño y morfología poliédrica se han caracterizado como fase alfa,

mientras que los de menor tamaño y más abundantes corresponden a fase gamma. El tamaño medio de los precipitados de fase alfa son de 200-400 nm mientras que los precipitados de fase gamma son de 75-125 nm de diámetro medio. En la Figura 2 (SEM x5000) se muestra una imagen de estos precipitados de fase alfa.

La muestra 2 presenta zonas con la presencia, al unísono, de los dos tipos de precipitados, debido a que provienen de la transformación de equilibrio :



En este caso su tamaño es mayor a los presentes en la muestra 1 debido al efecto de una temperatura mayor de ciclaje. Los precipitados de fase alfa tienen un tamaño medio de 1-2 μm y se encuentran junto a una gran distribución de precipitados de fase gamma, mucho menores, con un tamaño medio de 100-200 nm.

Este trabajo se complementa mediante la observación de una cinta de video donde se muestran las particularidades de esta precipitación.

AGRADECIMIENTOS.

Los autores agradecen a la CICYT la concesión del proyecto MAT89-0407-C03-02 con el que se ha sufragado parte de este trabajo.

Bibliografía

- (1) B.G. Mellor et al. Scripta Met. 20 (1986) 836-841.
- (2) J.M. Guilemany, F. Peregrín, F.C. Lovey, N. Llorca, E. Cesari. Metallography (1990) in press (MTL-1146).
- (3) M. Bouchard, G. Thomas. Acta Met. 23 (1975) 1485.
- (4) H. Kubo, A. Miyake, K. Shimizu. Trans.Jap.Inst.Met. vol.24 (1983) 603-612.
- (5) J. Pons, E. Cesari. Thermochemica Acta. 145 (1989) 237-243.

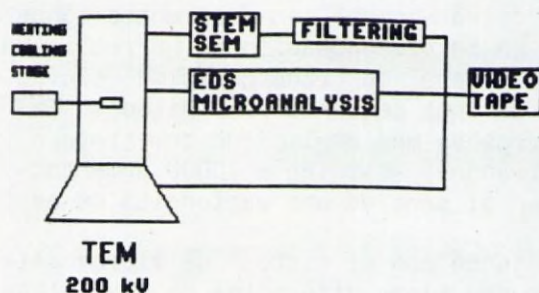


Figura 1

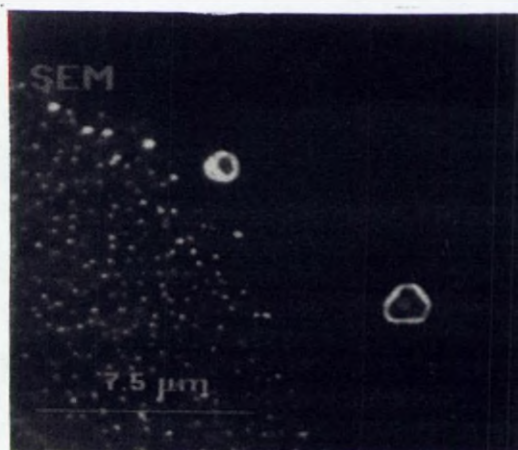


Figura 2

CARACTERIZACION MEDIANTE SEM(BSE)-EDS DE ESCORIAS PROCEDENTES DE LA ELIMINACION DE NIQUEL EN COBRE AFINADO TERMICAMENTE

*J.M. Guilemany, *F. Peregrín, +O. Guixà, +P. Rifà.

*Dpt. Metal.lúrgia. Fac. Químiques. Universitat de Barcelona
08028 BARCELONA.

+La Farga Lacambra S.A. Masies de Voltregà. 08519 BARCELONA.

Introducción:

La eliminación de níquel en el proceso de afino pirometalúrgico del cobre se ve dificultada por la desfavorable termodinámica, así como cinética, de la reacción :
$$\text{Ni} + 1/2 \text{O}_2 \longrightarrow \text{NiO} \quad (1)$$
 por la elevada solubilidad del níquel en el cobre.

Las diferentes escorias convencionales, bien ácidas o básicas, ensayas (2)(3)(4) no proporcionan rendimientos satisfactorios, para concentraciones de níquel bajas (5), dada la dificultad de formación de compuestos inorgánicos de níquel oxidados. La posibilidad de que el níquel pase a formar compuestos intermetálicos con elementos que a su vez pueden ser fácilmente oxidables, abren un nuevo camino a la eliminación del níquel en cobre.

Materiales y Métodos:

Los ensayos de afino pirometalúrgico se han realizado a escala de laboratorio en un horno de crisol, utilizando 4 kg de cobre. La temperatura de trabajo es de 1200°C y se ha utilizado un fundente de composición : 60% SiO_2 , 40% Al_2O_3 , 5% Fe_2O_3 .

Las muestras de escoria tomadas se preparan por embutición en resina conductora y recubrimiento con oro o grafito. Se estudian en técnica SEM, con detector BSE, y los microanálisis de las fases presentes se llevan a cabo mediante un sistema EDS con detector de elementos ligeros. El potencial de trabajo es de 15 kV.

Resultados y Discusión:

A partir de un cobre con un contenido inicial en Ni de 1823 ppm se lleva a cabo el proceso de oxidación, previa la adición de un 1% Al y un 1% Fe, utilizando fundente de silicato aluminico en una proporción del 75%. En el máximo de oxidación -9000 ppm O_2 en el cobre- se retira la escoria del baño líquido y se procede al proceso de reducción, obteniéndose una concentración final en Ni de 492 ppm.

El estudio al SEM(BSE) muestra una escoria, Figura 1 (SEM x1500), con diferentes fases presentes, todas ellas con contenido de oxígeno. El estudio mediante microanálisis EDS muestra que los glóbulos -marcado A- son mayoritarios en cobre, y de composición: 92% Cu, 3% Si, 3% Fe, 2% Al, siendo la fase con menor contenido en oxígeno en la escoria. La fase fibrosa laminar -marcada B- es de composición: 59% Cu, 24% Fe, 9% Al, 8% Si. Todo el níquel presente en la escoria tan sólo se encuentra en una fase -marcada C- de morfología globular y composición: 41% Al, 31% Fe, 18% Si, 10% Ni

El contenido en oxígeno de esta fase rica en níquel es superior al contenido medio de la escoria. La fase marcada D que actúa como fase matriz tiene una composición: 43% Cu, 34% Si, 13% Al, 9% Fe, 0.8% Ca, 0.2% Ni. La Figura 2 (SEM x2000) muestra otra zona con gran presencia de fase laminar, junto a fase rica en níquel -marcada C- y un gran glóbulo de cobre -marcado E-.

La utilización de las técnicas SEM(BSE) y EDS acopladas es fundamental para el estudio de este tipo de muestras y en este caso en particular ha permitido la diferenciación y caracterización de las distintas fases presentes. La utilización de un detector de elementos ligeros permite el conocimiento de la diferente distribución del oxígeno en las fases de la escoria, indispensable para muestras como éstas procedentes de un proceso de oxidación.

Así pues el níquel es eliminado por la formación de una fase Al-Fe-Ni que, en forma oxidada, es retenida por una escoria base silicato aluminico. El rendimiento global del proceso de eliminación del níquel es del 74% , siendo un resultado aceptable considerando el contenido inicial del cual se partía, y abre una nueva vía para la eliminación pirometalúrgica del níquel.

Bibliografía

- (1) Y. Takeda, S. Ishinata, A. Yazawa. Trans.Jap.Inst.Met. vol.24(7) (1983) 518-528.
- (2) A. Yazawa, I. Takeda. Trans.Jap.Inst.Met. vol.23(6) (1982) 328-333
- (3) H. Eerola, K. Jylhä, P. Taskinen. Trans.Inst.Min.Metal. vol.93 (1984) 193-199
- (4) I.V. Kojo. Acta Polytechnica Scandinavica. Chem.Tech. and Metal. Series nº 161 (Helsinki 1985) 48 pp.
- (5) S.A. Mastugin. Sov.J.Non-Ferrous Met. 26(3) (1985) 38-40



Figura 1

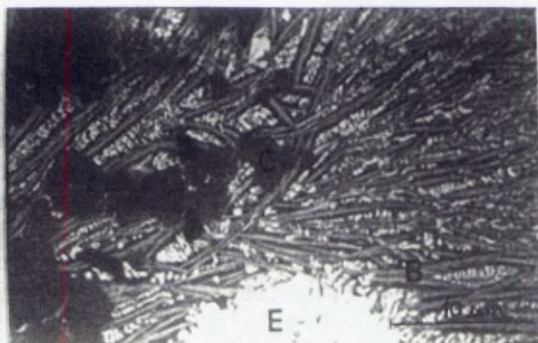


Figura 2

CARACTERIZACION Y MODIFICACIONES ESTRUCTURALES EN POLVOS DE CARBONITRURO DE TITANIO EN EL PROCESO DE OBTENCION DE CERMETS IDENTIFICADOS MEDIANTE TECNICAS DE SEM-EDS Y DE ANALISIS DE IMAGEN.

J.M.GUTLEMAN, I.SANCHEZ, N.LLORCA, J.R.MIGUEL. (*)

M.ALBAJAR, F.FERNANDEZ, E.SCHOMOLLING. (**)

(*) DPTO. I.Q. Y METALURGIA. FAC. QUIMICAS. UNIVERSIDAD DE BARCELONA. 08028 BARCELONA.

(**) DPTO. I+D BONASTRE S.A. 08140 BARCELONA.

Introducción: Las aleaciones investigadas son cermets a base de Ti(CN) - WC - Mo con fase metálica de Co - Ni. Las mejoras tanto físicas como mecánicas que pueden presentar se pueden explicar por la estabilidad química a altas temperaturas (800 C) de la fase carbonitrúro, siendo este el principal constituyente de estos Cermets.

Material y Métodos: El polvo de carbonitrúro de titanio utilizado ha sido el Ti(C,N) 70/30, obteniéndose un Cermet de acuerdo con las composiciones referidas en (1).

Se han trabajado con un microscopio electrónico de barrido ISI SS60 con poder de resolución de 60 Å dotado de un detector de electrones retrodifundidos BSE de elevado poder de resolución y un detector EDS de elementos ligeros. La naturaleza y composición de las fases presentes se han determinado mediante microanálisis de Rayos X (EDS) y sus estructuras cristalográficas mediante difracción de Rayos X. Asimismo mediante la técnica de análisis de imagen con un equipo MMP-AT de M.E.S.Ltd se han estudiado los parámetros morfométricos: perímetro (P), área (A), diámetro mínimo (D_{min}), diámetro máximo (D_{max}) y factor de forma definido como $FORM PE = 4\pi A/P^2$.

Resultados y Discusión: El polvo Ti(C,N) 70/30 utilizado presenta morfología angular y una dispersión de tamaño de grano grande (Figura 1) como lo corroboran los resultados de análisis de imagen, obteniéndose los siguientes valores medios, expresados en micrómetros con sus correspondientes desviaciones standard: $P = 5.00 + 3.77$, $A = 2.07 + 3.20$, $D_{min} = 1.02 + 0.85$, $D_{max} = 1.88 + 1.39$ y $FORM PE = 0.64 + 0.14$.

Mediante difracción de Rayos X se pueden distinguir en el Cermet dos tipos de picos: los correspondientes a la solución sólida de carbonitrúro de titanio a la que se ha incorporado wolframio, y los picos correspondientes a la fase metálica de Co que aparecen desplazados respecto a sus posiciones teóricas debido a la presencia por difusión de Ni, W, Mo y Ti.

La figura 2 muestra la aleación una vez sinterizada y atacada con $HCl + FeCl_3 + H_2O$, en donde las cavidades corresponden a las zonas en las que se encontraba la fase metálica de Co y Ni. La figura 3 es una imagen BSE donde se pueden diferenciar con mayor claridad las distintas fases: la fase α , correspondiente al carbonitrúro de titanio que aparece -marcada A-

contrastada en negro; la fase α_2 correspondiente a la zona de difusión alrededor del carbonitruro de titanio -marcada B- contratada en gris formada principalmente por carburos de Ti-W con mayor cantidad de Ti; la fase metálica de solución sólida de Co-Ni con elevado contenido en W y Ti -marcada C- contrastada en blanco bandeado; y una cuarta fase -marcada D- que también aparece contrastada en blanco, pero con formas facetadas y/o redondeadas que corresponden al carburo de wolframio con titanio en solución sólida.

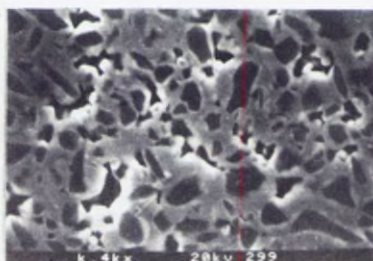
Mediante barridos lineales (LP) e imágenes de Rayos X comparativamente con áreas BSE debidamente seleccionadas se ha identificado la distribución de los elementos en la estructura, observándose que la concentración de Ti es máxima en la fase α_4 y que este difunde a través de toda la estructura. El C se encuentra distribuido a través de todas las fases presentes en la estructura. Y el N se encuentra únicamente en la fase α_4 de carbonitruro de Ti. Algunas de estas características estructurales señaladas están de acuerdo con los estudios realizados en STEM (2) y amplían el campo de la identificación estructural de los Cermets estudiados.

Bibliografía

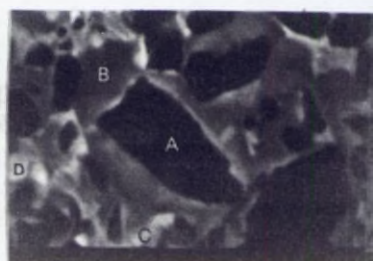
- (1) - Informe confidencial Bonastre S.A. - Dpto Metalurgia U.B. (1990).
- (2) - M.J.Reece, M.G.Gee and B.Roebuck.
Proceedings de la Royal Microscopical Society. Vol.25, Part.4, 525-26,
Julio (1990).



1



2



3

ESTRUCTURAS AL SEM DE NUEVAS ALEACIONES TENACES DE METAL DURO REVELADAS CON REACTIVOS DE ATAQUE PROFUNDO.

J.M.GUILEMANY, I.SANCHEZ, N.LLORCA, J.R.MIGUEL. (*)

M.ALBAJAR, F.FERNANDEZ, E.SCHOMOLLING. (**)

(*) DPTO. I.Q. Y METALLURGIA. FAC. QUIMICAS. UNIV. DE BARCELONA. 08028 BARCELONA.

(**) DPTO I+D BONASTRE S.A. 08140 BARCELONA.

Introducción: Las nuevas aleaciones tenaces estudiadas de metal duro (1)(2)(3) que se caracterizan por su alta resistencia mecánica y/o por su buena resistencia a la corrosión y/o por su bajo magnetismo, son aleaciones sinterizadas en fase líquida (HIP) de WC con una fase metálica de Co-Ni-Fe, que además contienen otros carburos en su composición como son el Cr_3C_2 y el Mo_2C . Cuatro han sido las aleaciones estudiadas siendo la diferencia entre ellas el porcentaje de sus componentes.

Material y Métodos: Se ha trabajado con un microscopio electrónico de barrido de 60 A de resolución a 20 Kv, dotado de un detector de electrones retrodifundidos (BSE).

La preparación de las muestras se ha realizado mediante las técnicas convencionales de desbaste y pulido hasta diamante de 1 μm , realizándose el ataque químico por inmersión en solución de Murakami (2.5 min.) para atacar los carburos de wolframio y con reactivo Nital al 2 % y 4 % o la solución de cloruro férrico para atacar únicamente la fase metálica. Los tiempos de ataque han variado desde los 2 minutos hasta los 40 minutos, con o sin utilización de baño de ultrasonidos. Igualmente se ha realizado un doble ataque con ambos reactivos.

La naturaleza y composición de las fases presentes en las aleaciones se ha comprobado mediante las técnicas de microanálisis de rayos X (EDS) a 15 Kv de potencial de trabajo, así como sus estructuras cristalográficas correspondientes mediante difracción de Rayos X.

Resultados y Discusión: Dos son las fases observadas: la fase correspondiente al WC con estructura hexagonal y la fase , fase metálica consistente en una solución sólida de Co-Ni-Fe con estructura CCC.

La figura 1 muestra la estructura de la aleación atacada con reactivo Murakami durante 2.5 minutos, donde los carburos de wolframio aparecen perfectamente delimitados. La figura 2 corresponde a un doble ataque (Murakami 2.5 min. + solución ácida de cloruro férrico 2 min.) donde el contraste es mayor. Y las figuras 3 y 4 corresponden a un ataque profundo de la fase metálica, realizado con Nital 4 % en ultrasonidos durante 40 minutos, donde se puede ver la geometría, profundidad y forma de enlazarse tridimensionalmente los carburos entre sí demostrando a su vez su consistencia, corroborando las buenas propiedades mecánicas resultantes y particularmente una tenacidad más elevada frente a las aleaciones de metal duro convencionales.

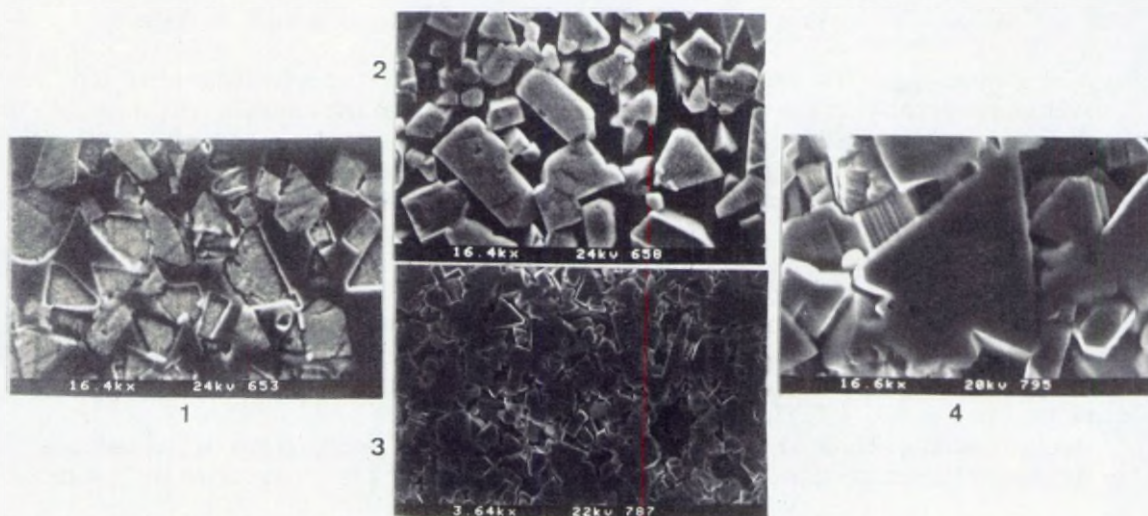
Mediante microanálisis puntuales en una de las aleaciones, en el centro de los carburos se detecta la presencia de W y C, y en la fase metálica se detecta y cuantifica un 52 % de

Co, 22.8 % de Ni, 12 % de Fe, 1.9 % de Mo, 1.86 % de Cr y un 10.4 % de W. Asimismo mediante las imágenes de rayos x de zonas concretas de la estructura y mediante la utilización de la técnica LP (line profile) se ha conocido los cambios de concentración de los distintos elementos a través de la estructura, observándose que la concentración de W en los carburos no es uniforme ya que es mayor en el interior que en la periferia de los carburos y que también se detecta Co, Ni y Fe en la periferia de los mismos. De la misma manera se detecta la existencia de W en la fase metálica.

Estas variaciones elementales tanto de W como de Co, Ni y Fe se interpretan como consecuencia de los fenómenos de difusión entre los carburos y la fase metálica.

Bibliografía

- (1)- J.M.Guilemany et al. Reunión Bienal de la RSEQ, ISBN 5472-1990, vol.1, pag.224, Salamanca (1990).
- (2)- M.Albajar et al. 3ª Reunión Nacional de Materiales, ISBN SE - 1721 vol.I, 333-335. Sevilla (1990).
- (3)- Publicación de caracter reservado. Universidad de Barcelona-Bonastre S.A. (1990).



EL MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BARRIDO COMO INSTRUMENTO DE ESTUDIO DEL BIODETERIORO DE OBRAS DE ARTE.

M. Hernandez Mariné*, J.J. Ortega Calvo ** y C. Sáiz Jiménez**

* Departamento de Botánica. Facultad de Farmacia.
Universidad de Barcelona. 08028 Barcelona.

** Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología
(C.S.I.C.) 41080 Sevilla.

Introducción:

Los materiales de construcción soportan el crecimiento de diversos organismos sobre su superficie. Los primeros colonizadores son, a menudo, algas microscópicas aerofíticas que tienen características similares a las de las algas pioneras de los suelos no inundados y, en algunos casos, se trata de las mismas especies. Las algas facilitan la retención de agua, que es el principal factor de erosión, y crean condiciones que permiten el crecimiento bacteriano o fúngico, dando lugar a comunidades microbianas que alteran la superficie de la piedra. El estudio *in situ* de estas comunidades mediante el MEB proporciona una información básica sobre estos organismos microscópicos y el deterioro de los materiales.

Material y Métodos:

El material examinado se obtuvo de la superficie de distintas estatuas de terracota que se encuentran en la Puerta del Perdón de la catedral de Sevilla, raspando zonas colonizadas. Para la observación en microscopio electrónico de barrido se utilizaron fragmentos que presentasen crecimiento algal, fijandolas durante dos horas en una mezcla de glutaraldehído al 5% y paraformaldehído al 2% en tampón cacodilato 0,1 M a pH 7,2, postfijando con osmio al 1%, deshidratando con alcohol y recubriendo con oro. Las observaciones se llevaron a cabo con un HITACHI H-800.

Resultados y Discusión:

Se han hallado comunidades epilíticas o casmolíticas de microalgas formando verdines o biofilms no continuos sobre todas las muestras, localizadas en la superficie exterior de las terracotas. La biomasa es más abundante en las zonas planas o en aquellas que presentan concavidades, introduciéndose en fisuras y grietas. En algunas muestras los filamentos algales forman asociaciones con musgos, filamentos fúngicos y/o líquenes. También se ha observado pequeños tallos de plantas. La germinación de las semillas es más lenta en presencia de la capa algal que en el suelo desnudo pero, una vez ha tenido lugar, su desarrollo es más rápido (1). Este hecho introduce un nuevo factor de deterioro.

Las algas más abundantes y que se encuentran en mayor número de las muestras estudiadas son la cianofícea filamentosa Microcoleus vaginatus y el alga verde filamentosa Klebsormidium flaccidum (Figura 1). Las

cianofíceas filamentosas pueden colonizar la superficie de las estatuas de forma aislada o con otros taxones, formando un inicio de estratificación. En este caso la capa exterior suele ser de cianofíceas mientras que, generalmente, *K. flaccidum* se encuentra debajo de ellas. En zonas con mayor humedad, o más protegidas de la desecación, *K. flaccidum* se encuentra sola formando haces de filamentos. También se observan fragmentos retenidos por la mezcla de las algas. Algunos parecen ser del mismo material de la estatua, pero en otros casos se trata de partículas de polvo y carbonáceas procedentes de la combustión de derivados del petróleo, y depositadas en la superficie (Figura 2), lo que evidencia el papel de los crecimientos algales en la formación de costras o pátinas. En las muestras estudiadas los mucílagos, que son el producto de una adaptación a las condiciones desfavorables de estos habitats extremos, son los principales responsables de la fijación de los filamentos algales al sustrato. Al desecarse se retraen y arrancan las partículas sobre las que se han fijado las bases de los filamentos, que quedan unidos al biofilm. No pueden además descartarse como causas de deterioro la formación de ácidos orgánicos ni la acidificación del sustrato producida por la respiración de la comunidad (2,3).

Bibliografía

1. McIlvanie S.K. 1942. Grass seedlings establishment and productivity- overgrazed versus protected range soils. *Ecology* 23:228-231.
2. Friedmann E. I. 1971. Light and scanning electron microscopy of the endolithic desert algal habitat. *Phycologia* 10:411-428.
3. Hoffmann L. 1989. Algae of Terrestrial Habitats. *The Botanical Review* 55:77-105.



Figura 1



Figura 2

PREPARACION DE MUESTRAS PARA EL CONTROL DE FABRICACION EN MICROELECTRONICA

Salvador Hidalgo, Antonio Fauquet
Centro Nacional de Microelectrónica (CSIC-UAB)
Campus de la UAB. 08193 Bellaterra (Barcelona)

Introducción:

Tanto en la puesta a punto de una tecnología, como en el análisis de fallos, es importante realizar unos controles de forma sistemática que permitan contrastar la bondad de las diferentes etapas de fabricación de los dispositivos, mediante unas técnicas sencillas y repetitivas.

La estrategia de análisis de una muestra microelectrónica se basa en dos etapas complementarias: un estudio superficial de las diferentes capas que la componen, y otro tridimensional con el fin de observar su estructura vertical.

Material y Métodos:

El estudio tridimensional se realiza mediante la técnica de microsección, que consiste en un corte transversal en la zona de estudio, tal como se describe en [1]. Esta se basa en la utilización para el desbaste/pulido de discos de polyester autoadhesivos provistos de una fina y homogénea capa de materiales abrasivos de diferente granulometría y dureza, utilizando el agua DI como elemento refrigerante.

Esta técnica presenta tres dificultades: el pequeño espesor de las capas consideradas, la distinta naturaleza de los materiales presentes, y la necesidad de observar la estructura en un plano de corte muy preciso. Con el fin de minimizar estas dificultades hemos diseñado un nuevo cabezal para la pulidora, que consiste en un bloque cilíndrico con una entalladura longitudinal que, junto con la guía de portacabezal, le asegura una caída vertical y coplanaria sobre el disco abrasivo.

Resultados y Discusión:

Este cabezal se complementa con un portamuestras para el SEM compuesto por un tornillo de cabeza exagonal planarizado según el ángulo deseado, permitiendo una sencilla reorientación de la muestra. La elección de los discos abrasivos depende de la dureza del material a tratar y de la distancia del área de interés al borde de la misma, aunque de forma general utilizaremos un disco de Carburo de Silicio de 9 micras de grano para el desbaste, seguido de discos 5 y 1 micras de Oxido de Aluminio para el pulido fino y el acabado.

Tras el proceso de pulido se procede a un ataque químico para realzar las diversas capas que componen el dispositivo. Partimos de la solución denominada *Dash Etch* [2] que está compuesta por 3:1:12 / HNO_3 :HF:HAc. La base de este revelado consiste en la inmersión en la mezcla de la muestra en posición invertida, de forma que sobre ella incida directamente la luz reflejada en la base del recipiente, con el fin de evitar el depósito de precipitados que dificulten la reacción. Esta solución se comporta como un buen revelador de propósito general, produciendo una buena delineación de todas las capas (figura 1).

El análisis superficial se basa en el estudio de las diferentes capas que componen la muestra y en su eliminación selectiva para obtener información de la posterior. Así, las capas de pasivación mediante nitruro o poliamida se atacan con plasma de O_2 y CF_4 , mientras que los óxidos se eliminarán fácilmente mediante HF. La metalización se elimina mediante la solución 2:1:1:16 / $H_2O:HNO_3:HAc:H_3PO_4$, mientras que el polisilicio se eliminará atacando el óxido sobre el que está depositado, alcanzando de esta forma el nivel silicio.

Si no metalizamos la muestra, observamos la definición de las distintas zonas N y P que componen el dispositivo, debido a que los fenómenos de absorción y emisión de electrones dependen del dopaje de estas zonas (figura 2), resultado equivalente al obtenido en el OM tras una tinción selectiva de dichas zonas mediante la solución *3-1 Stain* (3:1:10 / $HNO_3:HF:HAc$), que observada en el SEM sin metalizar nos permite determinar el canal activo del dispositivo por la razón anteriormente expuesta de la absorción/emisión en función del dopaje, que a su vez es un resultado equivalente al obtenido en el OM tras un revelado de uniones con la solución 3:1:3 / $HNO_3:HF:HAc$.

Con todo esto podemos concluir que hemos presentado una sencilla metodología para el control de procesos y/o análisis de fallos, un diseño propio para el cabezal de la pulidora que permite una sencilla reorientación de la muestra, fijando el plano de pulido el portamuestra del SEM. También se han presentado mejoras en la aplicación de diferentes técnicas para los ataques y revelados de las diferentes capas, habiéndose obtenido unos resultados satisfactorios y repetitivos, que permiten su utilización de forma universal para la observación de las muestras tanto en el OM como en el SEM.

Bibliografía

- [1].- B.R. Hammond, R.R. Danyew. "A microfinishing technique for semiconductor failure analysis". Proceedings of 1988 International Symposium on Testing and Failure Analysis. ISTFA'88. 161-165. 1988.
- [2].- E. Doyle, B. Morris. "Microelectronics. Failure Analysis Techniques. A procedural guide".

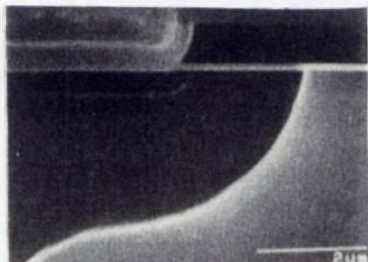


Figura 1

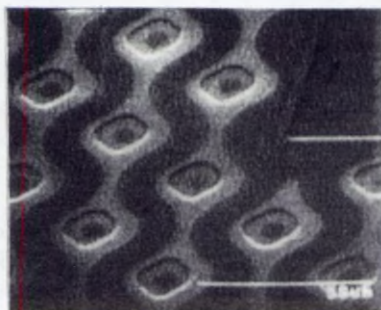


Figura 2

MORFOLOGIA DE LAS GRIETAS Y ANALISIS FRACTOGRAFICO DE LA ALEACION

Ti-6Al-4V A FATIGA OLIGOCICLICA.

M.Marsal, F.J.Gil y J.A.Planell.

Dpto. Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica.

E.T.S.Ingenieros Industriales Barcelona. Universidad Politécnica Cataluña.

Introducción:

El objetivo del presente trabajo ha sido el estudio de la morfología de las grietas producidas por deformación cíclica, observando su evolución hasta fractura, en la aleación Ti-6Al-4V con microestructuras: "mill-annealed" -procedente de forja a 950°C y recocidas a 700°C durante 2 horas- y Widmanstatten, obtenida mediante tratamiento térmico a 1050°C durante 1 hora y enfriadas en el interior del horno. La aleación en ambas microestructuras presentan un reblandecimiento cíclico desde el primer ciclo hasta fractura (1), siendo superior para el material "mill-annealed". En estudios de fatiga de muchos ciclos se ha demostrado que la propagación de las grietas es más sensible a la microestructura en el material Widmanstatten que en el material "mill-annealed" (2).

Las probetas pulidas y atacadas de ambas microestructuras se someten a ensayos de deformación cíclica de tracción-compresión a diferentes amplitudes de deformación y número de ciclos, llevándose por lo menos una probeta a rotura. El estudio de la nucleación y propagación de las grietas se ha realizado mediante Microscopía Electrónica de Barrido, no sólo por la geometría cilíndrica de la probeta, sino también por la profundidad de campo que permite observar la nucleación de grietas en su etapa inicial en relación a la microestructura. Las grietas superficiales se observan directamente, mientras que un corte longitudinal permite revelar su penetración hacia el interior en el estado I de propagación.

Resultados y Discusión:

La nucleación de grietas es similar en ambas microestructuras, puesto que en ambas se observa el inicio de grietas en bandas de deslizamiento de la fase α (granos equiaxiales de la estructura "mill-annealed" y placas α de la estructura Widmanstatten), a lo largo de las intercaras α - β y a través de las intercaras α - β (Figura 1). Sin embargo, existen diferencias ya que el material con estructura "mill-annealed" presenta en ciertos casos nucleación de grietas en el interior de los granos equiaxiales de α (Figura 2). La nucleación de grietas en intercaras α - β puede explicarse por la deformación incompatible por deslizamiento plástico entre las dos fases de diferente estructura cristalina, lo cual conduce a la descohesión. La nucleación de grietas en fase α , tanto en granos equiaxiales como en placas de Widmanstatten debe explicarse al deslizamiento planar que tiene lugar en la estructura hexagonal.

Las superficies de fractura para el material con microestructura "mill-annealed" tienen una morfología plana, no observándose que la propagación de grietas sea sensible a la microestructura de este material. En el caso del material con microestructura Widmanstätten, las superficies son muy facetadas correspondiendo a la orientación de las placas de Widmanstätten. En estas superficies de fractura se evidencia la presencia de estrias correspondientes a la propagación de la grieta. La enorme sensibilidad a la microestructura que se observa en la propagación de las grietas explica que la velocidad de propagación sea mucho menor en esta microestructura que en el material "mill-annealed" (3).

Agradecimientos.

Los autores del presente trabajo agradecen a Industrias Quirúrgicas de Levante S.A. la donación del material con el que se ha llevado a cabo este estudio.

Bibliografía:

- (1).C.H.Wells y C.P.Sullivan, Transactions American Society for Metals, 62, (1969) 263-270.
- (2).G.R.Yoder, L.A.Cooley y T.W.Crooker, Metallurgical Transactions, 8A, (1977) 97-99.
- (3).F.J.Gil, M.Marsal, M.Anglada y J.A.Planell. TRATERMAT 90. Congreso Nacional de Tratamientos Térmicos. Zaragoza 1990. Aceptado. Sesión Técnica B.

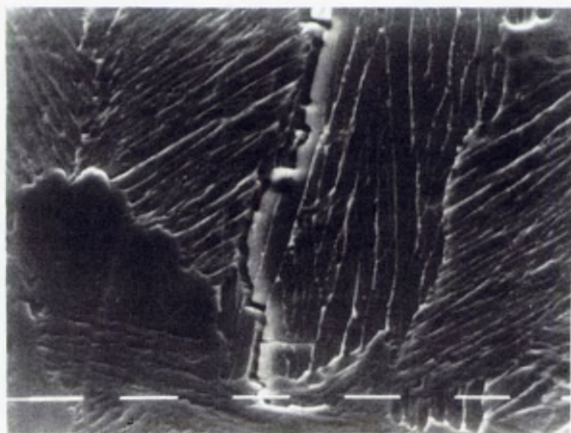


Fig.1. Grietas a lo largo y a través de las intercaras α - β . Cada trazo 10 μ m.

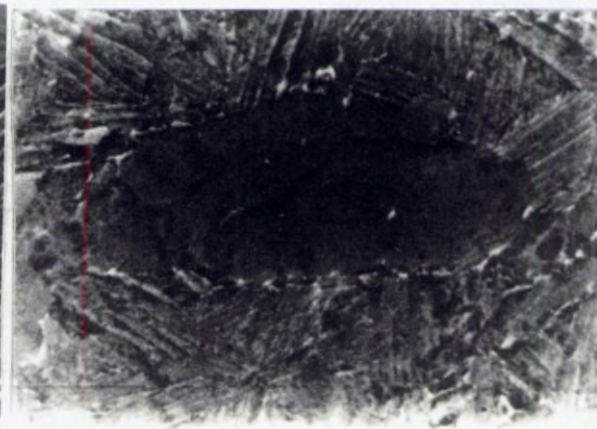


Fig.2. Grieta en el interior de un grano α . Cada trazo 1 μ m.

UTILIZACION DE LOS ELECTRONES RETRODISPERSADOS PARA LA CARACTERIZACION TEXTURAL DE LAS ROCAS

Menéndez, M. Montoto y C. de Llanos.

Departamento de Geología (Area de Petrología y Geoquímica)

Universidad de Oviedo

33080 Oviedo

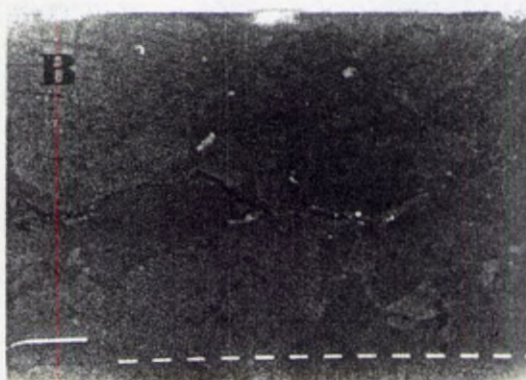
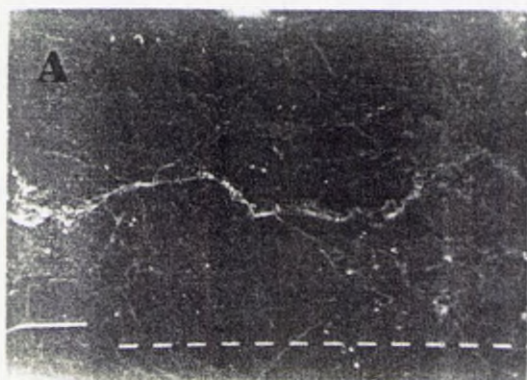
Desde ya tiempo que se viene utilizando el M.E.B. para el estudio textural de rocas tanto cementadas como cristalinas. En la mayoría de los trabajos la observación se realiza utilizando un detector de electrones secundarios. En este trabajo se constata la utilidad de los detectores de electrones primarios retrodispersados en estos estudios.

Podemos diferenciar tres grandes grupos en los que estas observaciones son de gran utilidad:

Al estudiar diferencias composicionales dentro de una roca. Como es sabido la cantidad de electrones retrodispersados que emite un material al incidir sobre él un haz de electrones depende del número atómico medio de este material. Así superficies que al ser observadas mediante un detector de electrones secundarios presentan una coloración uniforme al utilizar los electrones retrodispersados presentan diferencias notables en los niveles de gris asimilables a diferencias en la composición de los cristales.

Al estudiar la microfisuración de una roca y utilizando un detector de electrones retrodispersados, las diferencias en el relieve quedan claramente de manifiesto.

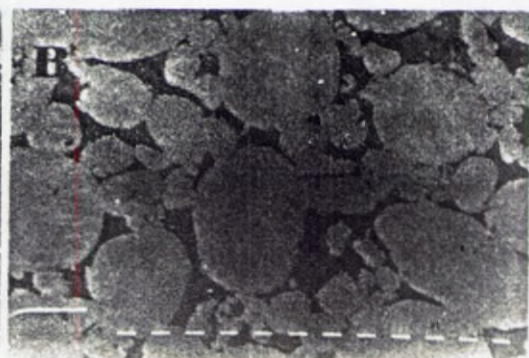
Al estudiar la porosidad de las rocas, fundamentalmente de las cementadas. Si impregnamos estas rocas con una resina al observar la superficie de las muestras así preparadas, los espacios rellenos con esta resina presentan una intensidad en la emisión de electrones retrodispersados distinta a la de los espacios minerales.



La semejante emisión de electrones secundarios por los minerales del granito impide discriminar aspectos texturales (bordes de grano, fases minerales...)(A). Sin embargo, la emisión de electrones retrodispersados al depender de diferencias composicionales, ofrece un mayor contraste entre minerales distintos (B).



También los electrones retrodispersados, modalidad topografía (B), son más útiles que los secundarios (A) para la discriminación de fisuras en análisis fractográficos.



Para observar la porosidad de las rocas, éstas suelen impregnarse con una resina epoxy. Con electrones secundarios no existe suficiente contraste entre resina y granos (A). Con electrones retrodispersados las diferencias son mucho mayores (B).

"ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRONICA DE ALTA RESOLUCION (HRTEM) DE UN SISTEMA HETEROEPITAXIAL CON UN ALTO DESAJUSTE"

S.I.Molina, G.Aragón y R.García

Departamento de Química Inorgánica
Facultad de Ciencias. Universidad de Cádiz.
Apdo. 40 11510 Puerto Real (Cádiz). España.

Introducción: En este trabajo se analiza, mediante HRTEM, la estructura de defectos en la región interfacial de sistemas InAs/GaAs (que poseen un desajuste alto, $((a_{\text{InAs}} - a_{\text{GaAs}})/a_{\text{GaAs}}) = 0.072$, crecidos por epitaxia de haces moleculares de capas atómicas (ALMBE), técnica que permite un crecimiento bidimensional. Se han encontrado contrastes en forma de bandas en la región interfacial; se dan posibles explicaciones para los mismos. También se presentan los resultados de un estudio teórico sobre las mejores condiciones para obtener información química en interfases a partir del uso de HRTEM.

Materiales y Métodos: Se ha estudiado un sistema heteroepitaxial InAs/GaAs, habiendo sido crecido el InAs por ALMBE hasta un grosor de 0.25 μm sobre un sustrato de GaAs a la temperatura de 400°C (el crecimiento se hizo en el Centro Nacional de Microelectrónica en Madrid). Se han preparado muestras en "cross section" para su estudio por HRTEM (en dicho estudio las muestras fueron orientadas con su eje de zona [110] paralelo al haz de electrones incidente) según el procedimiento convencional de clivado, lijado-pulido, dimple y ion mill. La microscopía electrónica de alta resolución se ha realizado en los microscopios electrónicos JEOL 2000 EX (Univ.Cádiz) y JEOL 4000 EX (Univ.Oxford).

Resultados y Discusión:

1. Distribución de dislocaciones en la interfase.

Se han encontrado los siguientes tipos de dislocaciones en regiones de InAs próximas a la interfase:

- de Lomer (suman las tres cuartas partes del número total)
 - de 60° no disociadas.
 - de tornillo disociadas en dos de 30° (éstas son excepciones)
- La mayoría de las dislocaciones están concentradas alrededor de la interfase, es decir, que el desajuste entre los parámetros sustrato-epicapa se relaja rápidamente gracias a la aparición de dislocaciones de desajuste (fig.1). Esta es una situación favorable para la utilización de un material con alto desajuste en dispositivos optoelectrónicos (ref.1). Se han observado unos contrastes en forma de bandas en la

región interfacial (fig.2). La principal causa que justifica este fenómeno de deformación es la existencia de escalones en la interfase -que se dan en nuestro material- (ref.5).

2. Estudio teórico de las mejores condiciones para analizar la composición química en una interfase InAs/GaAs a nivel de celda unidad, a partir de medidas de HRTEM.

Se supone la existencia de aleaciones desordenadas $\text{Ga}_x\text{In}_{1-x}\text{As}$. El estudio se ha hecho a partir de la función $\theta(x)$, siendo θ el parámetro definido en el método de "vector pattern recognition" (ref.4), habiéndose usado unas condiciones normales de trabajo en un JEOL 2000EX (con la muestra orientada según el eje de zona [110]). Para grosores de 100, 220 y 340 Å se obtiene una mayor facilidad relativa para diferenciar InAs de GaAs. En general se observa una baja dependencia de la forma de la función $\theta(x)$ con la apertura de la lente objetivo. Hasta grosores de muestra (t) de 80 Å se encuentra que $\theta(x)$ es lineal; x vendrá dado por $x=1-\theta/\theta_{x=0}$. Al aumentar el grosor, $\theta(x)$ se hace no lineal; hay algunos casos ($t=180$ Å, $x:[0.6,0.8]$; $t=360$ Å, $x:[0.4,0.6]$) en los que se diferencia mejor la composición.

- Bibliografía
- 1.A.Ruiz, L.González, A.Mazuelas, F.Briones. Appl. Phys. 1990 (aceptado para publicación)
 - 2.M.M.J.Treacy, J.M.Gibson. J.Vac.Sci.Technol. B4(6) (1986) 1458-1466
 - 3.S.N.G.Chu, A.T.Macrander, K.E.Strege, W.D.Johnston, Jr. J.Appl.Phys. 57(2) (1985) 249-257
 - 4.A.Ourmazd J.Crystal Growth 98(1989)72-81
 - 5.M.M.J.Treacy NATO ASI Serie B: Physics 203 (1989) 255-266
 - 6.F.Glas, C.Guille, P.Hénoc, F.Honzai IOP Conf. Series 87: Section 2 (1987) 71-76

L : DISLOCACION DE LOMER

4 nm

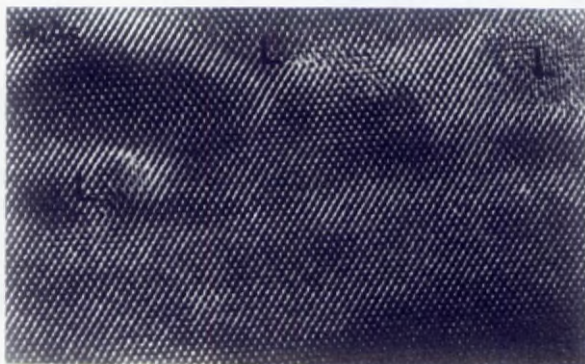


fig. 1

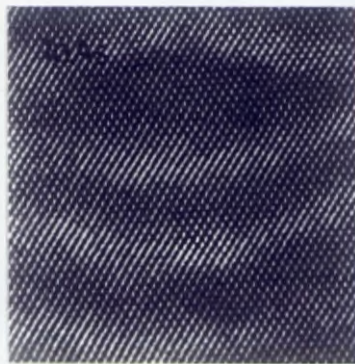


fig. 2

METODOS DE CONTRASTE DE VOLTAJE CUALITATIVOS CON HAZ CONTINUO

E. MONTERO, I. REBOLLO, R. GARCIA

Laboratorio de Componentes

TECNOLOGICA, S.A.

Introducción:

Las técnicas de Contraste de Voltaje (CV) como instrumento de análisis de la distribución de potenciales superficiales, presentan extraordinario interés en la verificación de las características eléctricas de los dispositivos electrónicos complejos. Como consecuencia, se han desarrollado una decena de diferentes técnicas de CV. En este trabajo se revisarán aquellas técnicas de CV cualitativas con haz continuo, dedicando especial atención a la denominada Digital Differential Voltage Contrast (DDVC). Se presentarán resultados prácticos, obtenidos en nuestro Laboratorio.

En esencia, la técnica de Contraste de Voltaje (CV) consiste en, por una parte, la aplicación a la muestra, desde el exterior del microscopio electrónico de barrido (MEB), de algún tipo de señal eléctrica y, por otra, en el análisis de aquellos efectos detectables mediante la señal de electrones secundarios y producidos como consecuencia de haber provocado un cambio de potencial en toda o en parte de la superficie de la muestra.

La baja energía característica de los electrones secundarios hace que éstos presenten una elevada sensibilidad a campos eléctricos no muy elevados. Será muy fácil, por lo tanto, influir sobre ellos mediante potenciales de sólo unos pocos voltios en la superficie de la muestra.

Material y Métodos:

Nuestros trabajos se llevaron a cabo, básicamente, mediante la utilización en un MEB Hitachi-570. Para la realización de las técnicas de Contraste de Voltaje Estático y Codificación de Voltaje se hizo uso de instrumentación diversa, tal como fuentes de alimentación, generadores de señales, caja de conexiones, etc.

En el caso de la técnica Differential Digital Voltage Contrast, el microscopio electrónico de barrido se conectó a un ordenador PDP-11, el cual es el encargado no sólo de efectuar la adquisición y procesamiento digital de los datos, sino que también de actuar como controlador del propio microscopio y de las señales que se aplican al dispositivo.

La programación para la adquisición y tratamiento de imagen permite el establecimiento de los parámetros de partida, así como determina el comienzo de la adquisición de las citadas muestras por punto con señal y la adquisición de las mismas sin señal. Efectúa también la sustracción de los resultados de ambos, la fijación de la intensidad umbral, la división por el brillo y envía los resultados al monitor. Este proceso se repite hasta completar la totalidad de los puntos de la pantalla.

Resultados y Discusión:

Contraste de voltaje cualitativo estático El Contraste de Voltaje Cualitativo Estático es la más simple e inmediata de las técnicas de contraste de voltaje. Consiste sencillamente en aplicar tensión continua a alguna parte, o partes, de la muestra. La imagen de electrones secundarios nos da cuenta inmediata de los efectos producidos. Basándonos en esta variación del brillo tras la aplicación de tensión podremos distinguir fácilmente las pistas polarizadas de aquellas que no lo estén.

El contraste de voltaje estático tiene variadas aplicaciones en identificación de elementos en dispositivos electrónicos, o en análisis de fallos. La localización de un cortocircuito entre dos pistas se ilustra en la figura 1. Presenta, sin embargo, bastantes limitaciones.

Codificación de Voltaje Este método, definido por D.L. Crosthwait, fue posteriormente descrito con detalle por Lukianoff y Touw, quienes lo denominaron 'Voltage Coding'. Permite la visualización, en la pantalla del MEB, de voltajes periódicos de frecuencia en el rango de los kilohertzios, hasta un máximo de unos pocos megahertzios.

La técnica de codificación de voltaje se basa en la transformación de la frecuencia y fase temporales de las señales dinámicas de entrada al dispositivo, en frecuencia y fase espaciales en la imagen de contraste de voltaje. Esta transformación es consecuencia de la interferencia entre la señal aplicada al dispositivo y la señal de barrido del MEB. Un pulso de voltaje en la superficie del dispositivo se convierte, por efecto del barrido del haz, en una banda en la pantalla del MEB; una serie de pulsos se convertirá en un cierto número de bandas claras y oscuras superpuestas a la zona del dispositivo por la que circule la señal. La técnica de codificación de voltaje permite, por lo tanto, observar diferencias de magnitud, de frecuencia y de fase entre pulsos aplicados al dispositivo.

diferencias de magnitud, de frecuencia y de fase entre pulsos aplicados al dispositivo.

Contraste de voltaje selectivo. La eliminación efectiva de los contrastes topográfico y composicional mediante el aislamiento del contraste debido al voltaje, es el objetivo que, por diferentes caminos, persiguen todos los métodos agrupados bajo la denominación de contraste de voltaje selectivo. Se pretende obtener exclusivamente información eléctrica en forma de un mapa de potenciales de la superficie de la muestra.

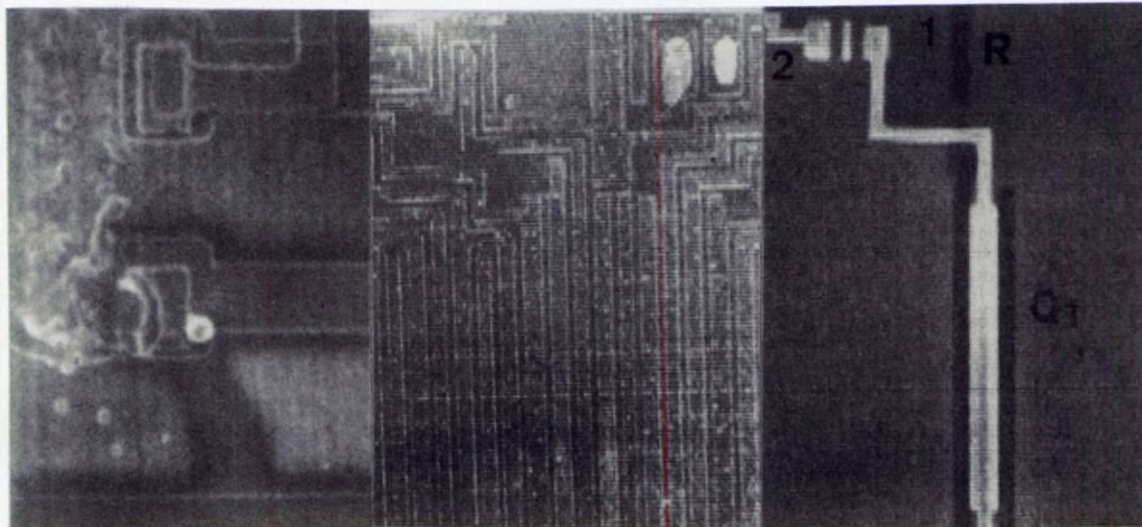
Trataremos a continuación uno de estos métodos de contraste de voltaje selectivo: el denominado Digital Differential Voltage Contrast (DDVC), desarrollado por Sardo y Vanzi. La técnica se basa, en esencia, en la sustracción de la imagen polarizada de la no polarizada. Pero no de la forma que parece mas inmediata, imagen completa polarizada de imagen completa no polarizada, sino que la imagen final se forma punto a punto y según el proceso que describiremos a continuación. Al dispositivo se le aplicará una señal variable con el tiempo (en concreto una onda cuadrada) y, por lo tanto, no continua como ocurría en el caso de Contraste de Voltaje Estático. A continuación se hace recorrer el haz electrónico por la zona de interés pero dejando que permanezca sobre cada punto un tiempo muy breve (del orden de unos pocos microsegundos), el tiempo justo para la adquisición de la señal de salida del detector de secundarios con la muestra recibiendo señal y sin recibirla. Acto seguido se digitalizan ambos valores y se realiza, mediante ordenador, la sustracción de los mismos, resultado que se lleva a la pantalla del MEB. Repitiendo este proceso para cada uno de los puntos de la zona de interés, se llegará a la imagen de contraste de voltaje prácticamente pura, sin apenas contenido topográfico ni composicional.

La fotografía,3 muestra un ejemplo de DDVC, sobre un inversor CMOS, cuya imagen de secundarios aparece en la figura 2. Notemos como la aplicación del DDVC revela:

- I) Información eléctrica casi en exclusiva: eliminación prácticamente total de los contrastes topográfico y composicional.
- II) El efecto inversor sobre la señal de entrada. Se observa la entrada 1 (negra, +5V) y la salida 2 (blanca, 0V) del inversor.
- III) Cierta información no detectable en la imagen de electrones secundarios: La interconexión de la pista 2 y una resistencia difundida R que conecta la metalización superior con el transistor Q1.

Bibliografía

- (1) D.L. Crothwait, F.W. Ivy, "Voltage contrast methods for Semiconductor device failure analysis". Scanning Electron Microscopy 1974, IITRI, Chicago, pp. 935-940
- (2) G.V. Lukianoff, T.R. Touw, "Voltage Coding: Temporal versus spatial frequencies", Scanning Electron Microscopy 1975, IITRI, Chicago, pp. 465-571
- (3) A. Sardo, M. Vanzi, "Digital Beam Control for Fast Differential Voltage Contrast", Scanning, Vol. 6, 1984, pp. 122-127
- (4) I. Rebollo, "La técnica de Contraste de Voltaje en el Control de Calidad de Dispositivos Electrónicos", Proyecto Fin de Carrera, E.T.S.I.T., Madrid, Curso 1988-89.



MICROESTRUCTURAS PRESENTES EN EL ALUMINIO DE MUY ALTA PUREZA (6N Y 5N) DEFORMADO POR FLUENCIA

M.L. Nó, C. Esnouf*, J. San Juan**

Dpto Física Aplicada II, *G.E.M.P.P.M., **Dpto Física Materia Condensada

Fac. Ciencias Univ. Pais Vasco, * I.N.S.A. de Lyon (Francia),

** Fac. Ciencias Univ. Pais Vasco

Introducción: El estudio de la movilidad de las subgranas creadas durante un flujo de fluencia puede ser de gran importancia a la hora de analizar los mecanismos que controlan el estadio II de fluencia, así como los mecanismos que controlan la plasticidad de los materiales poligonizados. Dicho estudio se llevará a cabo tanto mediante el análisis de las dislocaciones que constituyen dichas subgranas como a través de estudios dinámicos observando el comportamiento de las subgranas en función de la temperatura de recocido y de la tensión aplicada. En ésta comunicación se examinará la naturaleza de las dislocaciones que constituyen las subgranas así como su posible movilidad. Por otra parte, dado que las propiedades anelásticas evolucionan en función del grado de impurezas, se ha examinado su efecto sobre la microestructura.

Material y Métodos:

A fin de estudiar las características de la poligonización teniendo sólo en cuenta la movilidad de las dislocaciones se ha elegido un aluminio de muy alta pureza 99.9999% (6N). Dado que las características anelásticas quedan afectadas por 10 ppm de impurezas también se han examinado muestras de Al 99.999% (Al 5N) /1,2/. El tamaño de subgranos ha sido medido mediante microscopía electrónica de barrido en modo electrones retrodifundidos. La microscopía electrónica de transmisión nos ha permitido determinar la naturaleza de las dislocaciones que constituyen las subgranas así como la orientación entre subgranos /1,2,3,4/.

Resultados y Discusión:

Las observaciones mediante MEB indican que el tamaño de subgrano oscila entre 23 y 35 μm independientemente de la pureza del material.

Por otra parte, el análisis de las subgranas de poligonización mediante TEM nos ha conducido a los siguientes resultados generales tanto para el Al 5N como para el Al 6N.

En general las desorientaciones entre subgranos son bastante inferiores al 2° si bien en algunos casos (fluencia realizada a 575K) se han observado desorientaciones en torno de los 2°. Por otra parte muchas de las subgranas cambian de orientación a lo largo de la misma, lo que hace difícil determinar el grado de desorientación.

Las subgranas están constituidas por 1,2,3 ó 5 familias de dislocaciones siendo las más numerosas las de 3 y 5 familias.

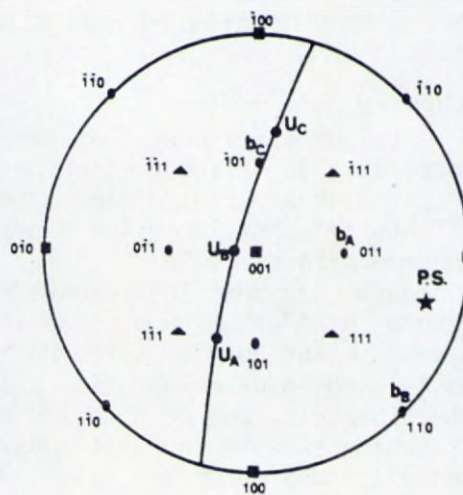
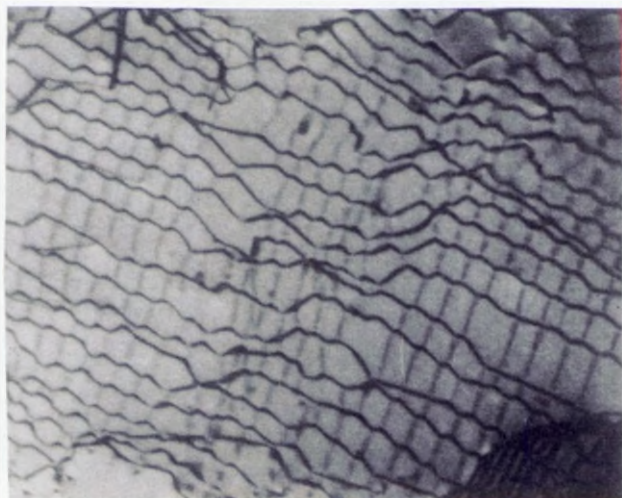
Las constituidas por 1 familia de dislocaciones son generalmente subgranas

de flexión donde las dislocaciones son a 60° . Así pues estas subjuntas se pueden mover unas veces por deslizamiento de las dislocaciones que las constituyen y otras por escalada /1-3/.

- Las subjuntas formadas por 2 familias de dislocaciones pueden moverse, en general, mediante escalada de las dislocaciones que las constituyen /2/.
- Las subjuntas constituidas por 3 familias de dislocaciones generalmente tienen 3 dislocaciones casi hélices ó 2 a 60° y 1 casi hélice. Del mismo modo las subjuntas formadas por 5 familias están generalmente formadas por 2 dislocaciones a 60° y 3 casi hélices /2/. En todos estos casos la subjunta podrá ser móvil si las dislocaciones casi hélice se llevan a su posición hélice mediante escalada ó mediante tensiones lo suficientemente elevadas /2,3/. A continuación la subjunta solo podrá ser móvil a temperaturas lo suficientemente elevadas como para que las dislocaciones puedan deslizarse sobre planos no compactos del tipo $\{100\}$ mediante un mecanismo indicado por Caillard /5/ (mecanismo de Friedel-Escaig). A dichas temperaturas las subjuntas podrán moverse, en general, mediante el deslizamiento de las dislocaciones a 60° en sus planos compactos y de las dislocaciones hélice sobre planos de deslizamiento no compactos $\{100\}$.

Bibliografía:

- /1/ M.L. Nó ; Thèse Université de Lyon (Francia) (1985)
- /2/ M.L. Nó ; Tesis Universidad del País Vasco (1990)
- /3/ M.L. Nó, C. Esnouf, J. San Juan, G. Fantozzi; Acta Met. 36 (1988) 827
- /4/ M.L. Nó, J. San Juan, C. Esnouf ; Materials Science and Engineering A 113 (1989) 281
- /5/ D. Caillard ; Phil. magazine A 51 (1985) 837.



Subjunta constituida por 3 familias de dislocaiones. Indexación

Determinación estructural del $\text{BaFeO}_{2.50}$ por HREM y CIP

M. Parras, X Zou,¹ S. Hovmoller,¹ M. Vallet-Regí,² J.C. Grenier³ y J.M. González-Calbet.

¹Dpt. Q. Inorgánica, F. Químicas. U. Complutense, 28040-Madrid.

²Dpt. Q. Inorg. y Bioinorgánica, F. Farmacia. U. Complutense, Madrid.

³Structural Chemistry. U. de Estocolmo. S-10691 Estocolmo, Suecia.

⁴Labor. de Chimie du Solide du C.N.R.S. 33405-Talence, Francia.

Introducción: El estudio del óxido $\text{BaFeO}_{2.50}$ por medio de difracción de rayos X ha dado lugar a una considerable polémica acerca del tipo estructural de dicho material, ya que su complicado diagrama de difracción de polvo ha sido interpretado en base a diferentes tipos de celda unidad (1,2). Con objeto de determinar la verdadera simetría de la celda, realizamos un estudio por difracción de electrones que permite concluir que se trata de una celda múltiple derivada de la estructura perovskita con simetría monoclinica, grupo espacial $P2_1/c$ y parámetros $a = 6.969(1) \text{ \AA}$, $b = 11.724(1) \text{ \AA}$, $c = 23.431(5) \text{ \AA}$, $\beta = 98.74^\circ$. La celda monoclinica contiene 28 subceldas perovskita y, por tanto, una composición $\text{Ba}_{28}\text{Fe}_{28}\text{O}_{70}$ (3).

Material y Metodos:

La muestra de composición nominal $\text{BaFeO}_{2.50}$, fue preparada por reacción en estado sólido a partir de las cantidades estequiométricas de $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ y BaCO_3 a 1100°C (24 h.), en atmósfera de Ar.

Dada la dificultad de obtener microcristales de $\text{Ba}_2\text{Fe}_2\text{O}_5$, hemos utilizado la microscopía electrónica de alta resolución (HREM) combinada con el procesamiento de las imágenes cristalográficas (CIP) para determinar la estructura.

Resultados y Discusion:

La imagen de alta resolución (HREM), según la dirección [100], figura 1, muestra un cristal bien ordenado.

El cálculo de la imagen a partir de programas de simulación (4), no es posible ya que no es obvia la interpretación de la estructura a partir de la imagen. Por esta razón se calculó la transformada de Fourier de una zona de poco espesor del cristal (figura 1) procesada ópticamente.

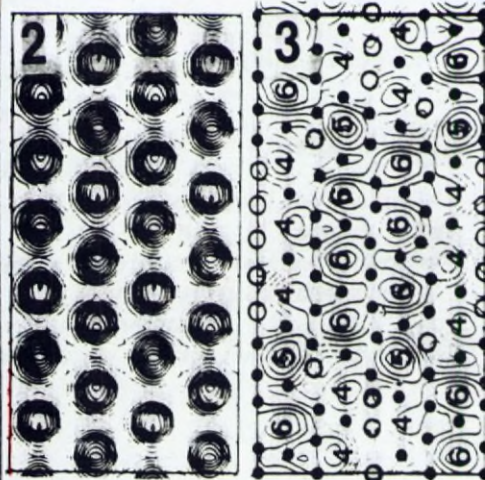
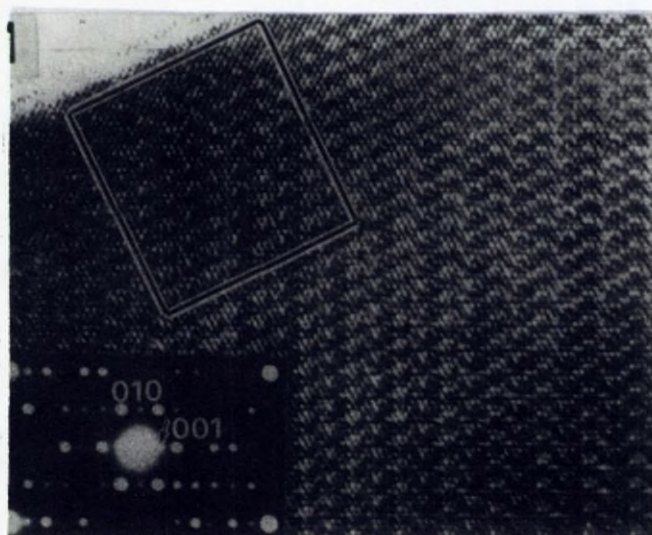
Después de asignar fases a las tres reflexiones más intensas del diagrama de difracción de electrones (DDE), se calculó el

mapa de densidad electrónica en la proyección (0kl), figura 2, que muestra 28 máximos que corresponden a las 28 posiciones atómicas de los metales, por celda unidad. La tercera dimensión de la celda unidad ($a = 6.969 \text{ \AA}$), corresponde a una disposición en la que los átomos de hierro de una capa se sitúan sobre los de bario de la capa contigua.

Considerando todas las reflexiones, e imponiendo las condiciones de simetría del grupo espacial $P2_1/c$, se obtiene el mapa de densidad, en la misma proyección que el anterior, de la figura 3. Pueden observarse tres tipos de máximos de densidad debidos a tres entornos diferentes de los átomos metálicos que, de acuerdo con los resultados obtenidos por espectroscopía Mössbauer (3), corresponden a 12 átomos de hierro en coordinación octaédrica, 12 en tetraédrica y 4 en pirámides de base cuadrada. De acuerdo con esto, las posiciones de oxígeno sin ocupar (indicadas por \bigcirc) se ordenan a lo largo del eje c como se indica en la figura.

Bibliografía

- (1) S. Mori, J. Amer. Ceram. Soc. **49**(11), 600 (1960).
- (2) B. Gallagher, J.B. MacChesney y D.N.E. Buchanan, J. Chem. Phys., **43**(2), 516 (1965).
- (3) M. Parras, L. Fournes, J.C. Grenier, M. Pouchard, M. Vallet Regí, J.M. González Calbet y P. Hagenmuller, J. Solid State Chem., **88**, 261 (1990).
- (4) D.F. Lynch y L.C. Qin, J. Appl. Cryst., **20**, 442 (1987).



PREPARACION DE HETEROESTRUCTURAS SEMICONDUCTORAS, POR SECCION TRANSVERSAL, PARA LA OBSERVACION EN TEM.

F. Peiró, J. Portillo, A. Cornet, J.R. Morante

Laboratori de Caracterització de Materials per la Microelectrònica. Dep. Física Aplicada i Electrònica. Univ. Barcelona. Diagonal, 645. Barcelona 08028.

Introducción:

La preparación de secciones transversales por ataque químico o electrolítico, de muestras como las heteroestructuras de semiconductores resulta, muchas veces, ineficaz. La diferente naturaleza de los materiales que componen las estructuras, se traduce en una distinta velocidad de ataque con lo que se imposibilita la observación de las interficies. En estos casos de muestras heterogéneas, el ataque iónico se configura como una técnica más adecuada, si bien persisten la mayoría de las dificultades. En el presente trabajo, se estudia el caso de heteroestructuras crecidas sobre sustratos de InP.

Material y Métodos: El adelgazamiento iónico consiste en bombardear las dos caras de la muestra con haces de Ar^+ . La muestra mantiene un movimiento rotatorio durante el ataque, que finaliza cuando una fotorresistencia colocada debajo del soporte, detecta la luz proveniente del laser situado en la parte superior. Las variables que intervienen son: intensidad de los haces iónicos, voltaje de aceleración, ángulo de incidencia, naturaleza de los iones, velocidades de rotación de la muestra, temperatura a la que éste tiene lugar. En nuestro caso, la presencia de un elemento tan volátil como el P, dificulta la optimización de estos parámetros.

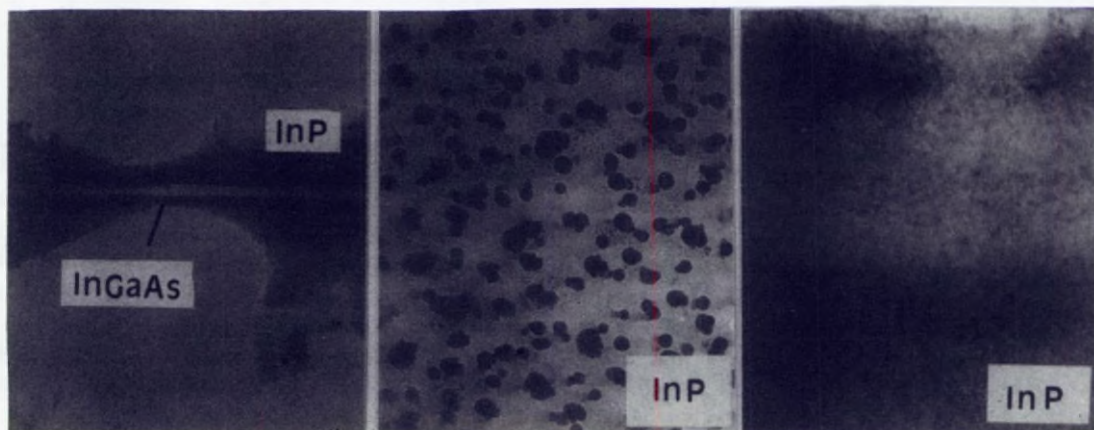
Resultados y Discusión:

Para la mayoría de materiales semiconductores, (Si, AsGa,...), las condiciones óptimas suelen estar en $I=0.6mA$, $V=05kV$ y $\alpha=15^\circ$. La utilización de estos parámetros fracasó debido a los siguientes problemas: el ataque tiene lugar de una forma preferencial sobre el sustrato, mientras las capas epitaxiadas permanecen demasiado gruesas para la observación. Las muestras resultan observables cuando se prolonga el bombardeo hasta la fragmentación del hilo central, con lo que se aumenta extraordinariamente la fragilidad de las preparaciones (fig.1). Este problema se solventó llevando a cabo el proceso mediante rotación selectiva. La velocidad de rotación de la muestra, es de 2 rpm o 10 rpm según el sector en el que focalicen los haces

de iones. Un segundo problema se planteó con la segregación de islas de In en el sustrato por evaporación del P (fig.2). Para evitarlo, se ensayó la realización del adelgazamiento, en un soporte refrigerado a 77 Ω K. Así, se observó una disminución de la densidad y tamaño de las islas. Sin embargo, el estado del sustrato, y con él el de la interficie, resultó insuficiente para una correcta observación en alta resolución. El problema fue solventado utilizando valores menores de intensidad y voltage (0.2 mA por cañón y 3kV respectivamente). Otra variable determinante de la calidad de la muestra, resultó ser la naturaleza del gas empleado durante el proceso. Así, la utilización del I^+ , condujo a resultados mucho más satisfactorios (fig.3). Por último, finalizar el ataque a un ángulo menor ($\alpha=10^0$) durante 2', aumentó la región observable. Conclusiones: Las muestras presentan mejores características si se reduce el tiempo de adelgazamiento iónico. Un pulido mecánico óptimo es una condición indispensable para que el ataque posterior no degrade las muestras antes de alcanzar el espesor mínimo necesario para la observación. La rotación selectiva, favorece el adelgazamiento homogéneo de las estructuras. Finalmente, la intensidad del haz y la tensión deben ser bajas.

Bibliografía:

P.J. Goodhew, "Thin Foil Preparation por Electron Microscopy", Practical Methods in Electron Microscopy, 11, (Elsevier, 1985)
T. Boone, Mat. Resear. Soc., 81, 115 (1988)



ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA PREPARACION DE SUBSTRATO SOBRE LA CALIDAD DE CAPAS CRECIDAS POR EPITAXIA DE HACES MOLECULARES.

F. Peiró, J. Portillo, A. Herms, A. Cornet, J. R. Morante.

Laboratori de Caracterització de Materials per la Microelectrònica. Dep. Física Aplicada i Electrònica. Univ. Barcelona. Diagonal, 645. Barcelona 08028.

Introducción: La optimización de los parámetros que intervienen en el crecimiento epitaxial de un material, ha resultado ser un requisito indispensable de cara a la fabricación de dispositivos electrónicos de calidad (1,2). Un paso previo a cualquier proceso tecnológico de epitaxia, precisa de un tratamiento del sustrato sobre el que se crecerán los materiales, con el objeto de obtener una superficie lo más perfecta posible al iniciar el depósito.

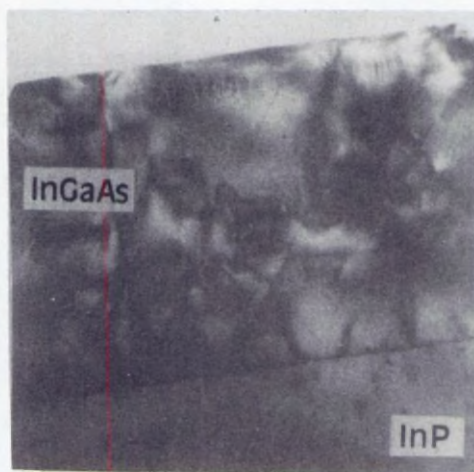
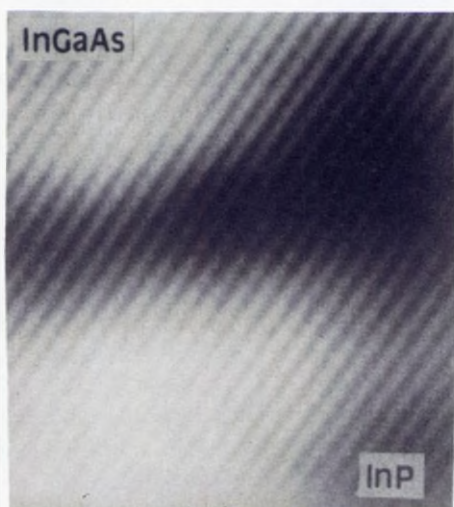
Material y Métodos: En el presente trabajo se comparan 2 métodos distintos, A y B, de preparación de sustratos en cuanto a su influencia en la calidad estructural de los materiales crecidos. Las muestras observadas son capas de $\text{In}_x\text{Al}_{1-x}\text{As}$ de espesor y fracción X variables crecidas por epitaxia de haces moleculares (MBE) sobre un silicato de InP. Las observaciones se han realizado con un microscopio HITACHI 800 NA con una relación entre puntos de 2'7 Å en muestras preparadas por sección transversal.

Resultados y Discusión: Las muestras fueron preparadas de forma que el haz de electrones incidiera según la dirección del eje de zona $\langle 110 \rangle$. Para la observación en modo de contraste de difracción se utilizó la reflexión 200. Para el estudio en HRTEM se utilizaron las reflexiones más próximas al haz transmitido: la cuatro 111, la dos 200 > la 220, es decir nueve haces. En estas condiciones, las imágenes muestran esencialmente la intersección de los planos (111) > (111). En la figura 1 se observa imagen de resolución por líneas de la interficie entre una capa de $\text{In}_{0.52}\text{Ga}_{0.48}\text{As}$ de 2 µm de espesor y el sustrato de InP preparado según el método A. Podemos apreciar una perfecta correspondencia de los planos de la familia (111) a los lados de la interficie. La característica más notable es

la ausencia de defectos en esta dirección a pesar de la existencia de una tensión entre la capa y el sustrato. La interficie presenta una rugosidad entre 20 y 60 Å. Cuando se aumenta la desadaptación del parámetro de mallas aparece en la interficie dislocaciones misfit 60° para adaptar las deficiencias cristalinas de capa y sustrato mientras que las regiones superiores han quedado libres de defectos, por lo tanto, con una mayor calidad estructural. La figura 2 muestra una imagen del mismo tipo de capa crecidas sobre sustrato preparado según método B. Se observa una gran densidad de defectos e interfaces (defectos de apilamiento y microtwins). Los microtwins se propagan e interaccionan disminuyendo la calidad estructural de las capas obtenidas. En conclusión podemos decir que mientras que en uno de los métodos de preparación, la interficie es totalmente abrupta y la capa crecida muestra una relajación de red nucleada a partir de misfits localizados en la interficie, en otros casos se observan interfaces menos abruptas y con rugosidad considerable. La presencia de restos del óxido nativo actúa como núcleo de defectos que se propagan en la capa la cual deviene inservible para la realización de dispositivos.

Bibliografía:

- 1 H.C. Wu, N.A. Olsson, D. Sirco, A.Y. Cho.
Applied Physics Letters. 56, 221 (1990)
- 2 H. Tamkin, T. Tambun-EK, R.A. Logan.
Applied Physics Letters. 56, 1210 (1990)



ESTUDIO DE INTERFICIES EN HETEROESTRUCTURAS DE InAlAs Y InGaAs SOBRE InP PREPARADAS POR CLEAVAGE

F. Peiró, A. Vilà, A. Cornet, J.R. Morante.

Laboratori de Caracterització de Materials per la Microelectrònica. Dep. Física Aplicada i Electrònica. Univ. Barcelona. Diagonal, 645. Barcelona 08028.

Introducción: El desarrollo de dispositivos avanzados basados en heteroestructuras de materiales III-V requiere el control de las características de las interfaces a escala atómica. En el caso de capas de InAlAs o InGaAs crecidas sobre InP, la diferente velocidad de ataque del sustrato en relación con las capas así como los problemas ocasionados por la descomposición del mismo, dificultan la aplicación de la microscopía en sección transversal como herramienta de control. En este trabajo, se presenta un método alternativo de estudio de interfaces basado en la observación de las zonas próximas a las aristas de los cristales obtenidos por "cleavage" de las muestras /1/.

Material y Métodos:

Se han estudiado capas de InGaAs y InAlAs crecidas sobre InP. Estos materiales, al presentar una estructura cristalina del tipo fcc son susceptibles de ser escindidos (cleaved) según el plano (110) presentando un ángulo de 90° que permite realizar observaciones en las direcciones $\langle 001 \rangle$ y $\langle 010 \rangle$. La región próxima a la arista de escisión es suficientemente delgada para ser observada por transmisión.

Resultados y Discusión:

En la figura 1 se observa la imagen en campo claro (BF) de una estructura constituida por una capa de InGaAs crecida sobre InP y preparada por cleavage. El espesor de las distintas capas así como las irregularidades en las interfaces resultantes de gradientes de composición en la dirección de crecimiento pueden ser medidas fácilmente. En la imagen representada en la figura 2 obtenida en condiciones de resolución de líneas pueden observarse mejor las características de la interficie. Tales como la rugosidad y la abrupticidad de la transmisión entre los planos de la capa y del sustrato. Por otro lado, las imágenes, obtenidas en condiciones de campo oscuro (DF), de las muestras preparadas por cleavage,

permite poner en evidencia la existencia de fluctuaciones de composición. Así, en la figura 3 podemos apreciar una fluctuación de contraste en una capa de $\text{In}_x\text{Al}_{1-x}\text{As}$ crecida sobre InP.

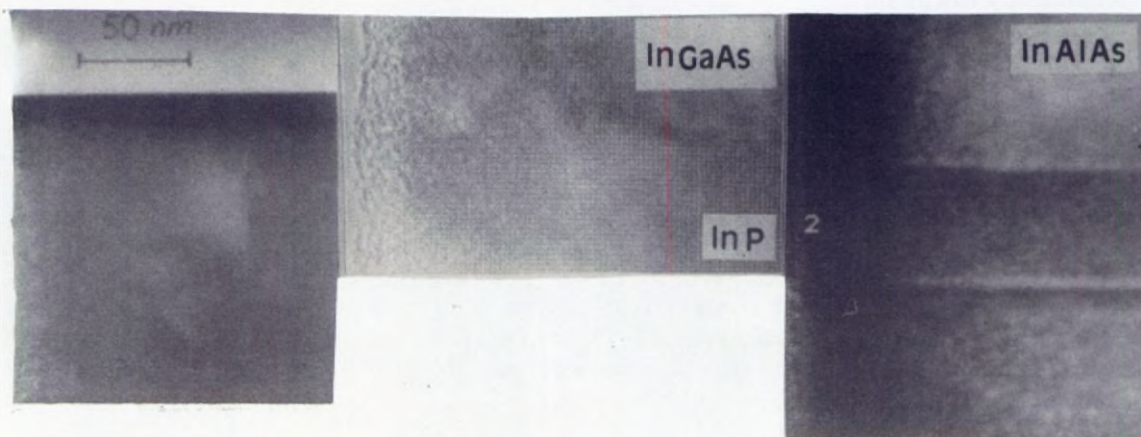
Estas fluctuaciones podrían ser debidas a paradas o cambios en la velocidad de depósito durante el proceso de crecimiento o, en general, a variaciones del flujo de la célula de Al.

En efecto, las variaciones de la fracción molar de Al dan lugar a una modificación del factor de estructura $F_{200}/2$ que da lugar a un cambio en las intensidad del haz difractado responsable de las fluctuaciones de contraste presentes en las imágenes.

El método de cleavage presenta otras ventajas como son la ausencia de contaminación de la muestra, el no provocar defectos adicionales durante la preparación y, sobre todo, la rapidez con que puede llevarse a cabo. Como inconvenientes, destacan la escasa región observable de cada muestra, la rápida degradación de la misma por contaminación ambiental tras el cleavage y la dificultad del montaje sobre la anilla de cobre, agravada cuando el portamuestras del microscopio tiene un ángulo de tilt limitado.

Bibliografía:

1. R. Spycher, P.A. Buffat, P.A. Stademann, P. Roetgen, W. Henberger, V. Gaf
Microscopy of Semiconductors Materials, 100, 299 (1989)
2. H. Oppölzer
Journal de Physique, 48, 5-65, (1987)



ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION DE CAPAS ENTERRADAS DE SiO_2 OBTENIDAS POR IMPLANTACION IONICA DE OXIGENO

J. Pérez Rodríguez, A. Vilà, A. Cornet, J.R. Morante

Laboratori de Caracterització de Materials per la Microelectrònica.
 Departament de Física Aplicada i Electrònica.
 Universitat de Barcelona. Diagonal 645. Barcelona 08028.

Introducción: Dentro del campo de materiales para aplicaciones VLSI (Very Large Scale of Integration), las tecnologías SOI/SIMOX (Silicio sobre aislante obtenido por implantación iónica de oxígeno y recocido térmico) presentan un gran interés, debido a la mejora en el funcionamiento de los circuitos obtenidos sobre estas estructuras /1/. No obstante, durante las diferentes etapas del proceso SIMOX se produce la introducción no intencionada de defectos. La optimización de esta técnica para la obtención de material de alta calidad requiere la caracterización estructural del material en función del proceso /1,2/.

Material y Métodos: En este trabajo se presenta la caracterización realizada mediante microscopía electrónica de transmisión de estructuras SIMOX obtenidas en una única etapa (SS) y mediante implantación y recocido secuencial (SIA) /1/:

Spec.	E (keV)	ϕ (cm^{-2})	T_{imp} ($^{\circ}\text{C}$)	T_r ($^{\circ}\text{C}$)	t_{rec} (h)
SS	200	1.7×10^{18}	640	1300	6
SIA	200	$3 \times (5 \times 10^{17})$	640	1300	3x2

Las observaciones se han realizado con un microscopio Hitachi 800 NA con una resolución entre puntos de 2.7 Å.

Resultados y Discusión:

En la figura 1 se observa la sección transversal de la estructura SS. Está formada por una capa de Silicio libre de dislocaciones precipitados de SiO_2 , y una capa enterrada de óxido que presenta islas de silicio en su interior. Los espesores de estas capas varían entre 280 y 310nm (Si) y 240 y 330nm (SiO_2), respectivamente, observados a lo largo de $2\mu\text{m}$ de la estructura. El espesor de la capa de Si mostrado en la figura 1 es menor que el indicado, debido a que durante la preparación de la muestra la capa se adelgazada. Las islas de Si en la capa de SiO_2 se distribuyen en dos bandas, a una distancia promedio de unos 100nm y 20nm de las interfaces Si/ SiO_2 superior e inferior, respectivamente. Su forma poliédrica es debida a la minimización de la energía libre interfacial /2/.

La sección transversal de la muestra SIA (Fig. 2) presenta una estructura formada por tres regiones claramente diferenciadas: una primera capa de Si sin precipitados ni dislocaciones y de gran uniformidad dimensional (con un espesor de unos 235nm), una segunda región de Si con precipitados de SiO_2 y dislocaciones y la capa enterrada de SiO_2 . Estas capas presentan espesores promedio del orden de 200 nm, y se caracterizan por presentar una interficie entre ellas con muchas oscilaciones, debido a la coalescencia de precipitados de óxido en la capa enterrada. No obstante, el espesor de la estructura total es bastante uniforme (de unos 650nm). Además, no hemos observado nunca la prolongación de los defectos de la segunda capa en la más superficial.

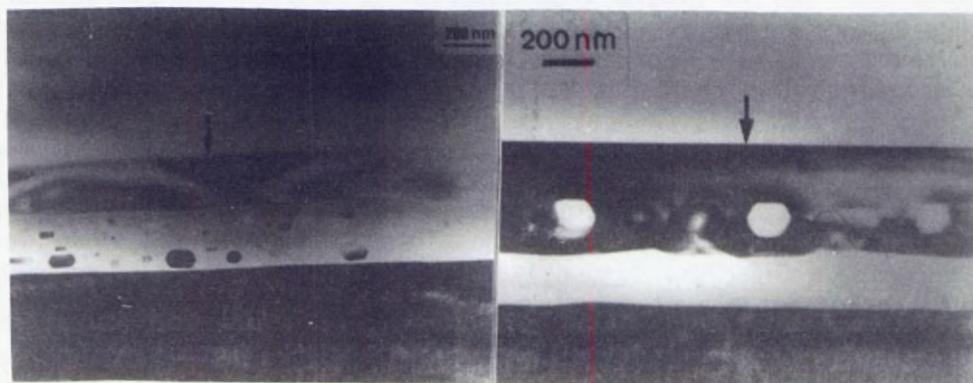
El análisis efectuado, por tanto, pone de manifiesto que los procesos SS y SIA utilizados no corresponden a procesos optimizados. Aún así, ambos se caracterizan por la obtención de una capa superficial de Silicio de alta calidad. El análisis de estas muestras mediante técnicas ópticas /3/ ha corroborado la alta calidad de la región superficial, indicando también una mejora de la calidad del material SIA respecto las estructuras SS.

Bibliografía:

- /1/.- A.H. van Ommen, Nucl. Int. Meth. Phys. Res. B39, 1194 (1989)
- /2/.- A. Cornet, J. Portillo, A. Pérez Rodríguez, F. Peiró, J.R. Morante, a publicar en Anales de Física B
- /3/.- A. Pérez, J. Portillo, A. Cornet, J. Jiménez, J.R. Morante, P.L.F. Hemment, K.P. Homewood, 8th Int. Conf. Ion Impl. Techn., Guildford (UK), Agosto 1990.

Fig.1

Fig.2



ANALISIS DE DEFECTOS POR TEM EN CAPAS DE GaAs CRECIDAS SOBRE Si

J. Portillo, A. Cornet, P. Peiro, A. Herms, J.R. Morante, Y. González, L. González, F. Briones.

Laboratori de Caracterització de Materials per la Microelectrònica. Dep. Física Aplicada i Electrònica. Univ. Barcelona. Diagonal, 645. Barcelona 08028.

Introducción:

La gran diferencia de parametros de malla que existe entre GaAs y Si (4%) da lugar a que las capas de GaAs crecidas por epitaxia sobre substratos de Si presenten una gran densidad de dislocaciones. Una de las soluciones propuestas para reducir esta densidad consiste en la utilización de la técnica de haz molecular por capas atómicas (ALMBE) (1). En dicha técnica, la estequiometría de la superficie cambia bruscamente en cada ciclo, promoviendo la nucleación bidimensional, incluso en condiciones de gran desajuste de parámetros de red (2)

Material y Métodos:

Las muestras estudiadas fueron crecidas mediante la técnica ALMBE en las primeras 0,2 μm y haz molecular convencional (MBE) posteriormente. Para su observación por microscopía electrónica de transmisión, las muestras han sido preparadas por los métodos de sección transversal convencional (3) por cleavage y por planar view.

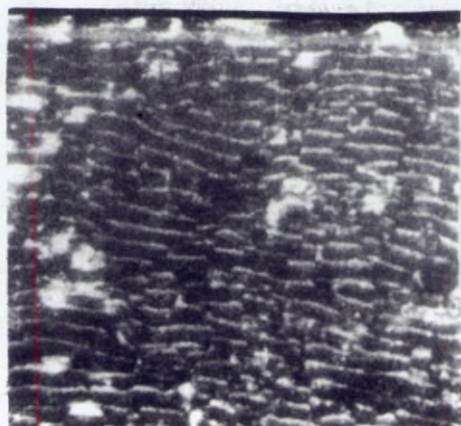
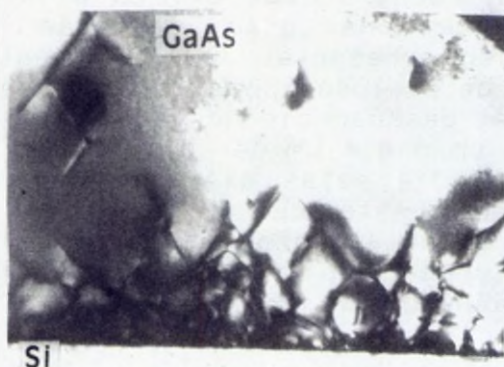
Resultados y Discusión:

La figura 1 muestra una imagen TEM de capas de GaAs crecidas por ALMBE sobre un substrato de Si. En ella se puede observar la presencia de una gran cantidad de dislocaciones, cuya distribución presenta las siguientes características: (1) la densidad de dislocaciones decrece desde la interficie hacia la superficie, desapareciendo la mayoría de ellas a una distancia de unos 0,3 μm o 0,4 μm de la interficie. (2) en su camino hacia la superficie estas dislocaciones se curvan y vuelven a entrecruzarse hasta que desaparecen al encontrar otra dislocación. Este comportamiento puede explicarse teniendo en cuenta que la tensión producida por la desadaptación del parámetro de malla tiende a curvar las dislocaciones

filiformes hacia la interficie con el fin de que a interaccionar unas con otras produzcan dislocaciones "misfit" en la interficie las cuales son las energeticamente favorable para adaptar capas de distinto parametros de malla. Para un mejor estudio de estos defectos, se han realizado observaciones con la muestra planar view. Las imagenes en campo claro con un haz de electrones paralelos a la direcci3n 001 muestran las franjas de interferencia Moire debido a las reflexiones (220) del GaAs y del Si. Estos patrones Moire se ven modificados por la presencia de defectos en la interficie. La observaci3n de imagenes en campo oscuro bajo diferentes condiciones de difracci3n permite obtener la red de dislocaciones presentes en la interficie. (figura 2). Las im3genes de alta resoluci3n permiten distinguir los 2 tipos de dislocaciones que aparecen en la interficie, como dislocaciones Lomer y dislocaciones misfit de 60° , esta 3ltima con su vector de Burger inclinado 45° respecto a la l3nea de la interficie. La distancia promedio entre las dislocaciones Lomer es de 90\AA . La diferencia con el valor esperado, si toda la desadaptaci3n de red fuera acomodada por este tipo de dislocaciones 99\AA es debida a la presencia de dislocaciones 60° menos efectiva para acomodar las redes.

Bibliograf3a:

1. F. Briones, L. Gonz3lez, A. Ruiz.
Applied Physics 49, 729 (1989)
2. L. Gonz3lez, A. Ruiz, A. Mazuelas, G. Armelles, M. Recio, F. Briones
Superlatt. and Micros. 5 (1989)
3. A. Romano, J. Vanhellmont, H. Bender, J.R. Morante
Ultramicroscopy 31, 183 (1989)
4. H.C. Tasi, Y.C. Kiao
Journal Applied Physics, 67, 2862 (1990)



CARACTERIZACION POR MEB Y EDRX DE EFLORESCENCIAS SALINAS EN DIFERENTES MONUMENTOS

L. Pérez Rodríguez, A. Justo Erbez, C. Maqueda* y E. Gómez Asensio*

Instituto de Ciencia de Materiales de Sevilla, Apdo. 1115, 41080 Sevilla

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, Apdo. 1052, 41080 Sevilla

Introducción:

El estudio de la alteración y conservación de obras de arte realizadas en piedra, morteros y pinturas, influidos por fenómenos de tipo salino es un problema de gran importancia. Uno de los primeros pasos es conocer el tipo de sales presentes con objeto de evaluar el daño y poder actuar sobre ellas para su eliminación o inactivación.

Para el estudio de las sales es de gran importancia conocer su morfología, composición química, tipo de sal, así como su forma de interaccionar con la matriz. Para ello las técnicas más adecuadas son la Microscopía Electrónica de Barrido con Analizador químico y Energías de Rayos X, complementado con Difracción de Rayos X.

Material y Métodos:

Las muestras se pegan en el porta con carbón coloidal, o se depositan sobre una cinta adhesiva de doble cara que previamente ha sido adherida al porta metálico. A continuación metalizan en un equipo Polaron con oro y se observan al microscopio electrónico de barrido marca ISI modelo SS 40 a 20 Kv de tensión.

El estudio químico se realizó empleando un analizador de energías dispersivas de Rayos X marca Kevex, modelo 8.000.

La caracterización por difracción de Rayos X se llevó a cabo en un difractómetro marca Siemens modelo D-501.

Resultados y Discusión:

Se estudian muestras de sales encontradas como eflorescencias, costras superficiales en el interior de esculturas cerámicas, morteros y rocas de construcción procedentes de pinturas murales árabes de la Casa de la Contratación de Sevilla; esculturas cerámicas de la Puerta del Perdón de la Catedral de Sevilla, Cartuja de Sevilla, Palacio de Jabalquinto (Jaén), Monasterio de San Jerónimo (Granada), Monasterio de San Isidoro del Campo, Antiponce (Sevilla), Iglesias de Cortelazor, Hinojales y Aroche (Huelva) y zona monumental de Cáceres.

Las sales encontradas son:

Halita: NaCl

Yeso: $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

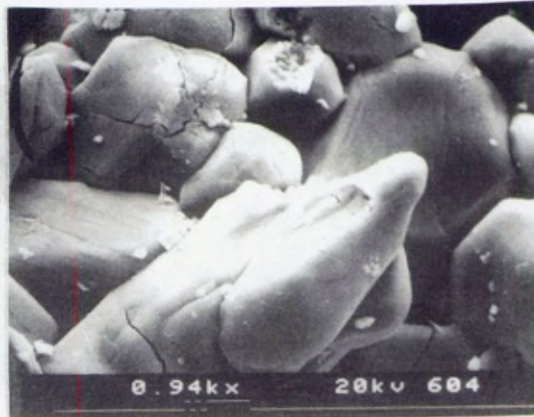
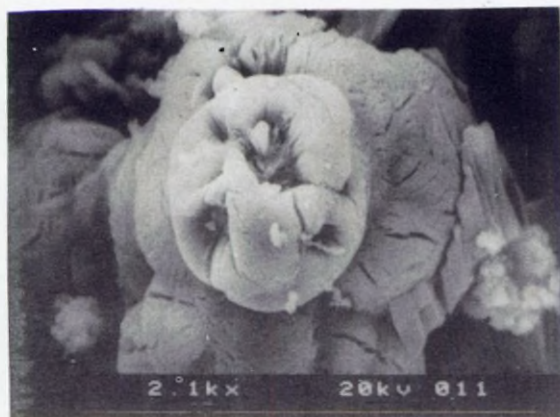
Calcita: CaCO_3
 Tenardita: Na_2SO_4
 Hexahidrita: $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
 Nesqueonita: $\text{MgCO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
 Dypingita: $\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$
 Epsomita: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

La formación y el tipo de las sales está influida por la composición de los materiales originales, deposición, reacción del material original con el medio ambiente, y deposición y reacción por efecto de agua capilar.

Destacan la formación de yeso por reacción del material original con productos de contaminación atmosférica y transportados por el aire, así como la formación de sales magnésicas (carbonatos y sulfatos hidratados) en pinturas murales, producidas por la alteración de dolomitas existentes en el mortero. La halita, en algunos casos de pinturas murales, no se debe a contaminación externa, sino que se ha agregado intencionadamente para aumentar la velocidad de fraguado.

Bibliografía

- ARNOLD, A., KUENG, A. (1985). Crystallization and habits of salt efflorescences on Walls. Methods of investigation and habits. Vth International Congress on Deterioration and Conservation of Stone, Lausanne, 25-27.9. 1985, 255-268.
- ARNOLD, A., ZEHNDER, K. (1990). Salt Weathering on monuments. Advanced Workshop. Analytical Methodologies for the Investigation of Damaged Stones. Ed. F. Veniale and U. Zezza. Pavia (Italia), 14-21 Septiembre 1990.



MICROESTRUCTURA Y MICROANÁLISIS POR SEM/EDX Y STEM/EDX DE GRANATES UVAROVITA

J.Ma.Rincón, J.Alarcón, M.A.Tena y J.Cardá.

Instituto de Cerámica y Vidrio, C.S.I.C., Arganda del Rey, Madrid.

Dpto. Química Inorgánica, Facultad de Químicas.

Dpto. Química Inorgánica, Col.legi Universitari de Castelló, Universitat de Valencia.

Introducción: El granate uvarovita, grupo espacial Ia3d, de fórmula química: $\text{Ca}_3\text{Cr}_2\text{Si}_3\text{O}_{12}$, tiene amplio uso en la industria cerámica como pigmento, donde es conocido como Verde Victoria. En la bibliografía aparece bien descrita la síntesis de este granate por vía cerámica (1,2), señalando que esta fase es estable hasta $1370 \pm 10^\circ\text{C}$, disociándose a temperaturas más altas en silicato cálcico y óxido de cromo (3). El objeto del presente trabajo es caracterizar microestructural y microanalíticamente por SEM/EDX y STEM/EDX una serie de pigmentos del sistema uvarovita-granularita obtenidos por primera vez por la gel coloidal (4).

Material y Métodos: Se han preparado mezclas estequiométricas de uvarovita, mediante la técnica gel coloidal, partiendo de los precursores: cloruros de calcio y cromo y sílice coloidal, Ludox (4). Las muestras calcinadas a 1260°C durante 2 días presentan una coloración verde brillante. Las fases cristalinas que aparecen en los difractogramas DRX de estas muestras son: uvarovita, pseudowollastonita, CaSiO_3 y eskolaíta, Cr_2O_3 . La microestructura y composición de los materiales se ha obtenido por SEM/EDX (ZEISS DSM-950 TRACOR serie Z-II), trabajando a 20kV y sobre las muestras en polvo. Los microanálisis STEM/EDX se han obtenido mediante un equipo HITACHI H-800/KEVEX, trabajando a 200kV, calibrando previamente el aparato con patrones (CaCrO_4 , mullita y gehlenita), determinando las constantes de Cliff-Lorimer: k_{AlSi} , k_{CaSi} y k_{CrSi} a 100 y 200 kV (5).

Resultados y Discusión: Los resultados del microanálisis SEM/EDX han mostrado que existe una gran variación en los porcentajes de SiO_2 y Cr_2O_3 entre los diferentes granos analizados. En general se detecta un exceso de óxido de cromo respecto al teórico introducido y al análisis realizado por AA, lo que en principio podría atribuirse a un efecto de fluorescencia o bien a posibles efectos de absorción de la radiación X en este tipo de pigmentos con estructura granate (6). Existe a escala microscópica una fuerte variación de composición que indicaría una microheterogeneidad composicional en este tipo de fases. La microestructura (fig. 1) muestra unos granos muy sinterizados, con los bordes de grano redondeados. La tabla 1 presenta los resultados microanalíticos STEM/EDX. Se observa que los resultados del promedio de la muestra son muy próximos a los obtenidos por análisis convencional. Se aprecia que existe también en este caso una fuerte variación de composición no sólo en diferentes granos sino también

dentro de un mismo grano, confirmando la microheterogeneidad de esta fase. El exceso de sílice que se aprecia en algunos casos se debe a la presencia de wollastonita como fase secundaria. Respecto al contenido de Cr_2O_3 detectado en este tipo de microanálisis STEM/EDX se observan valores dentro del margen de lo esperado, mejorando notablemente los resultados obtenidos por SEM/EDX, aunque en algunos puntos puede existir exceso de este elemento. Se puede concluir que los análisis realizados en un microscopio electrónico analítico TEM/STEM/EDX y a 200 kV permiten obtener resultados más fiables para el estudio de este tipo de fases cristalinas.

Tabla I. Resultados del microanálisis STEM/EDX de las muestras obtenidas vía gel coloidal y calcinadas a 1.260°C/2 días.

% en peso	SiO_2	CaO	Cr_2O_3
Promedio	33,70	36,07	30,23
spot en grano	29,20	31,08	39,73
" " "	58,83	22,70	18,46
valor medio (6 spots)	$41,34 \pm 3,80$	$34,81 \pm 3,20$	$23,85 \pm 2,70$

Bibliografía 1.- F. A. Hummel, Amer Mineral., 35 (1950) 3-4, 324-5; 2.- J. Alarcón P. Escribano, J. J. Gargallo, Br. Ceram. Trans. J., 83 (1984), 3, 81-83; 3.- F. P. Glasser, E. F. Osborn, J. Amer. Ceram. Soc., 44 (1958), 9, 358-367; 4.- J. Carda, G. Monros, P. Escribano, J. Alarcón, J. Amer. Ceram. Soc., 72, (1989) 1, 160-162; 5.- J. Ma Rincón, J. Carda, G. Monros, J. Alarcón, este mismo volumen 1991; 6.- K. M. Krishnan, P. Rez, G. Thomas, Acta Cryst., B41 (1989), 396-405

AGRADECIMIENTOS Los autores desean expresar su agradecimiento al Servei Central de Microscopia Electronica (T. Montán, A. Tato, P. Gómez) de la Universitat de Valencia por las facilidades dadas para la realización de este trabajo. Asimismo J. Ma Rincón agradece al S.F.P. la financiación de su estancia en la Universidad

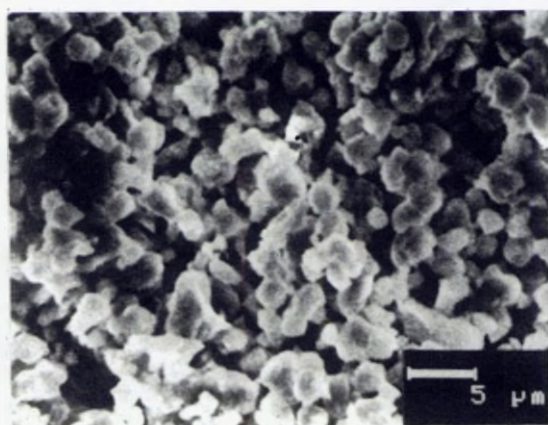


Fig. 1a. Microestructura por SEM de la UVAROVITA.

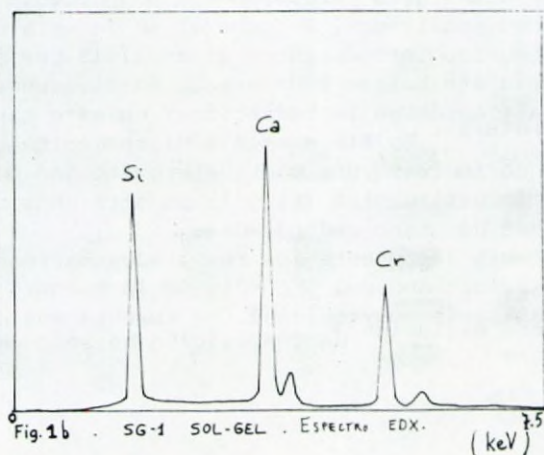


Fig. 1b. SG-1 SOL-GEL. ESPECTRO EDX. (keV)

DETERMINACION EXPERIMENTAL DE LAS CONSTANTES DE CLIFF-LORIMER PARA EL ANALISIS POR STEM/EDX DE GRANATES DE CROMO DE UVAROVITA.

J.Ma.Rincón, J.Cardá, G.Monrós y J.Alarcón

Instituto Cerámica y Vidrio, C.S.I.C., Arganda del Rey, Madrid
Dpto. Química Inorgánica, Col.legi Universitari de Castelló.
Dpto. Química Inorgánica, Facultad de Químiques.
Universitat de Valencia.

Introducción: Desde que comenzaron a usarse con fines analíticos las configuraciones TEM/EDX (o microscopios electrónicos analíticos) en Ciencia de los Materiales existe la necesidad de disponer de patrones estables para calibrar los detectores de dispersión de energías de rayos X.

Dado que en este tipo de microanálisis se utilizan normalmente láminas delgadas, esto permite aplicar la aproximación de Cliff-Lorimer (1) que prácticamente elimina los efectos correctores de número atómico, absorción y fluorescencia (corrección ZAF), lo que simplifica notablemente los cálculos de los resultados del microanálisis.

El propósito de este trabajo es determinar las constantes de Cliff-Lorimer (C-L) en patrones previamente seleccionados que permitan el microanálisis TEM/STEM/EDX en fases granates (2).

Material y Métodos: Se han elegido como materiales patrón los siguientes: wollastonita, previamente analizada por análisis químico; mullita ($\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_7$) de Baikalo; gehlenita ($\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{SiO}_2$) previamente sintetizada por Rincón y al. (3) y cromato cálcico sintetizado por vía cerámica a 1.000°C y analizado por Absorción Atómica (4). Los materiales elegidos fueron finamente pulverizados y depositados sobre pieles de carbón evaporado (aproximadamente 200 \AA de espesor) preparados sobre rejillas de cobre convencionales para TEM, de 300 mallas.

Los factores k_{CaSi} , k_{AlSi} y k_{CrSi} se han calculado a partir de las correspondientes intensidades de las líneas k de emisión de R.X. de los elementos químicos indicados, obtenidos en una configuración TEM/STEM/EDX, Hitachi H800/KeveX Quantum 8000, tanto a voltaje de 100 kV como a 200 kV. Se han ensayado varias aperturas de condensador y se ha operado en el modelo STEM

Resultados y Discusión: Se han obtenido espectros EDX en el modo STEM a 100 y 200 kV considerando diferentes aperturas de condensador, es decir, 1 y $5 \mu\text{m}$ a 100 kV y 0,1 y $1 \mu\text{m}$ a 200 kV. Se ha observado a 100 kV que las constantes k_{CaSi} aumentan hasta la 3a. apertura disminuyendo al utilizar la 4a. apertura de condensador. Asimismo, no está muy claro para ambos voltajes de aceleración si los valores de las constantes de C-L están afectadas por el tamaño del haz. Lo que sí se observa es que los valores de k_{CaSi} obtenidos a 200 kV son menores que para 100 kV existiendo una menor dispersión cuando se trabaja a mayor voltaje de aceleración. Los valores promediados a 100 y 200 kV entre las diferentes condiciones ensayadas serían: a 100kV = 0,97 y a 200 kV = 0,78.

Los valores de la constante del aluminio ($1,64\text{keV}$) respecto al pico del silicio tomado como referencia se han determinado a partir de dos tipos de

de patrones: la gehlenita sintética anteriormente citada (3) y una mullita comercial de BaikaloX.

Los valores promediados de k_{AlSi} entre las diferentes condiciones ensayadas utilizando el patrón de gehlenita han sido: a 100 kV= 1,23 y a 200kV= 1,24. Los valores promediados en el caso del patrón de mullita han sido: a 100kV= 1,53 y a 200kV= 1,31. Como se vé, estos valores difieren bastante de los obtenidos con gehlenita, siendo bastante más elevados que en otro tipo de mullita y de lo que era de preveer teórica y experimentalmente. En el caso de la constante k_{CrSi} al no disponer de un patrón en el que se encuentran simultáneamente las emisiones de Cr y Si, se han ensayado con dos patrones de mezclas mecánicas de $Cr_2O_3-SiO_2$. Los valores obtenidos fueron muy erráticos y alejados totalmente de lo que era de preveer debido a la alta dispersión de composición de los granos por ser una mezcla mecánica. Por tanto, debe rechazarse el uso de mezclas mecánicas como patrones en el caso del microanálisis TEM/STEM/EDX. La determinación indirecta de la constante en $CaCrO_4$ sintetizado, trabajando en las mismas condiciones anteriores es de $k_{CrSi}=1,03$. En la figura 1 se recogen los valores obtenidos a 100 y 200 kV en relación con los teóricos a 100 kV de la bibliografía (5). Como se observa, los valores se aproximan mucho en el caso del Al y difieren algo en el caso del Ca a 200 kV, siendo el del Cr muy próximo al previsto teóricamente. La fiabilidad de estos patrones ha sido comprobada con STEM/EDX en soluciones sólidas de granates.

Bibliografía (1) G.Cliff and G.W.Lorimer, J.Micrsc.,103(1.975)203-207. (2) J.Carda, M.I.Burquète,G.Monrós,P.Escribano and J.Alarcón, J.Eur.Ceramic Soc.,6,(1.990) 97-105. (3) J.Ma.Rincón,P.Pena,S.de Aza, S.Moya, G.Thomas, Science of Ceramics (1.986). (4) J.Carda, Tesis Doctoral, Univ. de Valencia, 1.990. (5) D. B.Williams, Practical Analytical Electron Microscopy in Materials Science, Ed.Philips Electronic Instruments, New Jersey (1.984).

AGRADECIMIENTOS: Los autores desean xpresar su agradecimiento al Servei Central de Microscopia Electrónica (T.Montán, A. Tato y P.Gómez) de la Universitat de Valencia por las facilidades dadas en la realización de este trabajo. Asimismo J.Ma.Rincón, agradece al S.F.P. la financiación de una estancia en la citada Univ.

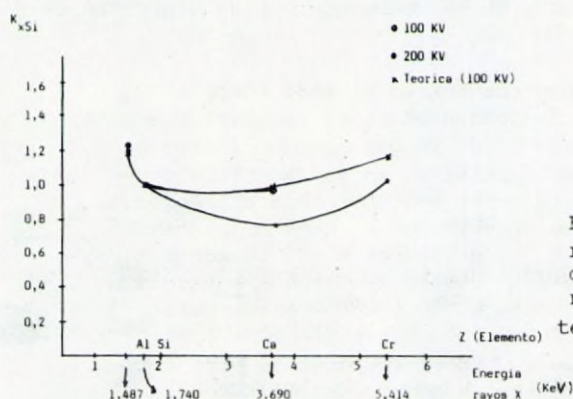


Fig1.-Valores de las ptes. de C-L respecto al Si en función de la energía de emisión de R.X. (línea k_{α}) y del número atómico: a 100 y 200 kV y valores teóricos (5).

MATERIALES ROCOSOS OBSERVADOS MEDIANTE MICROSCOPIA ACUSTICA. COMPARACION CON LA MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO.

A. Rodríguez, G.A.D. Briggs[†], M. Montoto.

Dpto. de Geología. Universidad de Oviedo.

[†]Dpt. of Materials. University of Oxford. GB.

Introducción:

La microscopía acústica de barrido (SAM) es una técnica relativamente reciente, década de los 70, que utiliza ondas ultrasónicas (de frecuencias superiores a 100 MHz) para la formación de imágenes de materiales muy diversos.

Las principales ventajas se deben a que dichas ondas tienen la capacidad de penetrar en materiales que son opacos a las radiaciones electromagnéticas y, sobre todo, a que las características de la imagen dependen del contraste entre las propiedades elásticas de los componentes de la muestra; tal contraste puede ser mayor que en otras propiedades utilizadas para formar imágenes. Así, la SAM puede aportar información distinta a la suministrada por otras microscopías como la SEM y la óptica.

Material y Métodos:

Las imágenes presentadas se han obtenido con 2 microscopios, el OXSAM y el ELSAM, en el Dpto. de Materiales de la Universidad de Oxford. La SAM suele ser por reflexión y las muestras deben tener su superficie plana y pulida con una rugosidad inferior a la longitud de onda utilizada. Siempre que el grosor de la muestra sea mayor que la distancia de trabajo de la lente, las reflexiones acústicas del soporte de la muestra apenas afectan el contraste de las imágenes. Tanto las secciones pulidas como las delgado-pulidas, usadas en petrografía óptica y SEM son adecuadas para microscopía acústica.

Resultados y Discusión:

En la SAM un transductor emite ondas ultrasónicas (de frecuencia entre 300 y 2000 kHz) que se transmiten por una lente de zafiro y son enfocadas a través de un fluido (generalmente agua) sobre la superficie de la muestra. Las ondas reflejadas retornan a través de la misma lente hacia dicho transductor donde se convierten en señales eléctricas cuya amplitud se usa para modular el brillo de un TRC. La imagen se forma por rastreo de la lente.

En el caso de rocas y otros materiales de suficiente rigidez, se forman ondas Rayleigh en la superficie de la muestra que viajan a lo largo de ella y que se ven afectadas por la anisotropía cristalina y las discontinuidades superficiales; las características elásticas de la muestra condicionan el contraste de la imagen. Así pues, la SAM hace posible la observación de estructuras intragranulares en los materiales (zonas de distinta deformación, etc) con más claridad que en microscopía óptica. También las imágenes acúst

cas son muy útiles en estudios microfractográficos porque muestran los cracks más diminutos, incluso más pequeños que una longitud de onda y a bajos aumentos, así como su posición con respecto a la textura del material. En la Fig. 1 pueden compararse imágenes de dos cuarzos de la misma zona de una muestra de granito bajo SAM (a, 350 MHz y b, 1,6 GHz) y SEM (c y d). La anisotropía elástica del cuarzo permite diferenciar ambos granos y varias zonas en el de la derecha, no observables bajo SEM. Además, en las imágenes acústicas se señalan dos microfisuras (marcadas con un *) que no se observan en la imagen electrónica obtenida aproximadamente a los mismos aumentos. Sólo después de saber su posición pueden observarse bajo SEM, pero a mucho más aumento, (la fig. 1d muestra el pequeño tamaño de la fisura de la derecha).

Bibliografía

BRIGGS, G.A.D. (1985). An introduction to Scanning Acoustic Microscopy. Royal Microscopical Society Handbook 12. Oxford University Press, Oxford.

RODRIGUEZ REY, A.; BRIGGS, G.A.D.; FIELD, T.A. y MONTOTO, M. (1990). Acoustic microscopy of rocks. Journal of Microscopy, Vol. 160, Part 1, pp. 21-29.

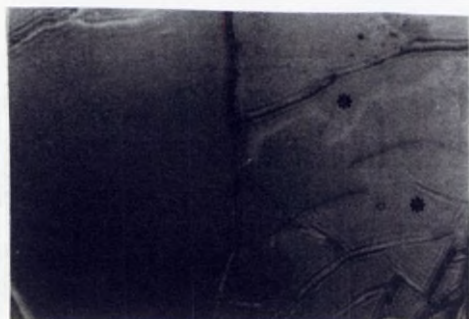
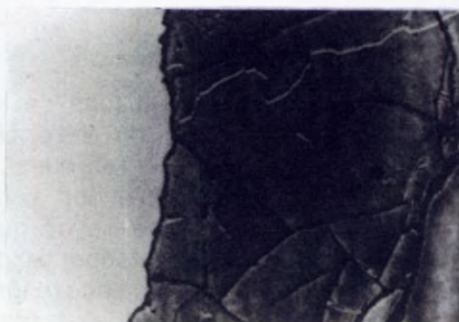
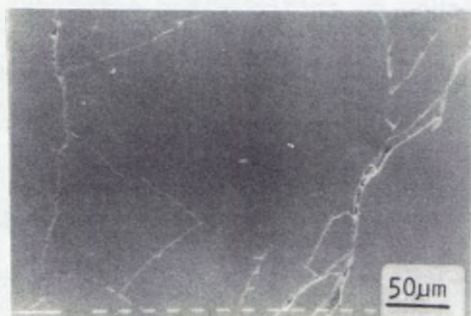


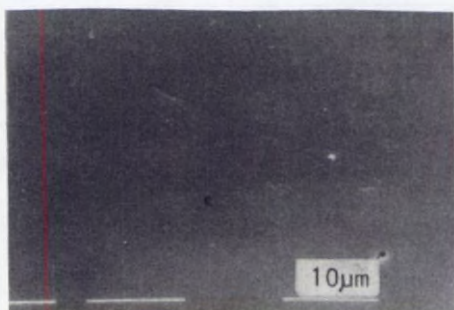
Fig. 1a. S.A.M. 350 MHz.



1b. S.A.M. 1,6 GHz



1c. S.E.M.



1d. S.E.M.

APLICACIONES DE LA MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO EN EL ESTUDIO DEL CLINKER DE CEMENTO PORTLAND

A. Rodríguez. M. Montoto, C. de Llanos[†] y B. Menéndez.

Dpto. de Geología. Universidad de Oviedo.

[†]Servicio de Microscopía Electrónica. Universidad de Oviedo.

Introducción:

El clinker de cemento Portland puede considerarse como una roca artificial cuya fabricación industrial se optimiza mediante estudios de índole muy diversa con objeto de obtener en las mejores condiciones un clinker de características idóneas.

La MEB permite el estudio tanto mineralógico como textural del clinker. A partir de estos datos, se obtiene una información, en muchos casos exclusiva, sobre las características del proceso de fabricación (molienda, homogeneización, cocción y enfriamiento). También pueden estimarse ciertas propiedades del clinker y del cemento (molturabilidad, resistencia mecánica, etc.)

Material y Métodos:

La MEB ofrece la ventaja de poder utilizar muestras de superficie de fractura cuya preparación es fácil y prácticamente inmediata y que permiten un estudio muy completo de las características del clinker.

También pueden utilizarse superficies pulidas, especialmente para la determinación de la composición mineralógica cuantitativa o para estudios composicionales mediante espectrometría de rayos X por energía dispersiva. En este caso, se puede utilizar la técnica del desbaste iónico como etapa final de la preparación de muestras, obteniéndose muestras realzadas texturalmente que permiten un estudio preciso de sus características.

Resultados y Discusión:

Debido a la gran profundidad de campo y al amplio rango de aumentos de la MEB, los rasgos texturales del clinker pueden determinarse de forma rápida y sencilla. Características como tamaño medio de los fenocristales, distribución, grado de idiomorfismo de los mismos, homogeneidad textural, cantidad aproximada y distribución de la porosidad, etc, pueden evaluarse en superficies de fractura en un tiempo razonablemente corto; la figura 1 corresponde a una imagen de este tipo que puede servir como ejemplo de la capacidad de la MEB para obtener el tipo de datos antes mencionados.

En cuanto a la información mineralógica, existe el problema de que la respuesta de emisión de electrones secundarios es bastante similar en todas las fases del clinker, por lo que la identificación de las mismas ha de hacerse en función de sus características morfológicas (forma, hábito, grado de

idiomorfismo, maclado, etc). Afortunadamente esto es posible de forma rutinaria. En la Fig. 2, por ejemplo, puede identificarse la alita (A) por el alto grado de idiomorfismo de sus cristales de hábito pseudohehagonal; la belita (B) puede distinguirse por su hábito redondeado y, además, la presencia de un doble sistema de estrías permite caracterizarla como de tipo I según Insley (1936). Otras fases mineralógicas, como la cal libre y la periclasa, pueden ser también identificadas. En cuanto a las fases de la matriz, la MEB constituye una técnica muy apropiada para su estudio con ventajas sobre las técnicas de microscopía óptica, dado el pequeño tamaño de dichas fases.

Todos estos datos obtenidos mediante MEB son muy importantes en la práctica ya que suministran información sobre las características del proceso de fabricación industrial del clínker (grado de molienda y homogeneidad del crudo, aptitud a la cocción, características de los procesos de cocción y enfriamiento, etc); también permiten estimar algunas propiedades del mismo (molturabilidad, resistencia de los morteros, entre otras).

Bibliografía

GOUDA, G.R. (1979). Clinker characterization by SEM. Proc. Scanning Electron Microscopy. Vol. I, pp. 387-398.

RODRIGUEZ REY, A. (1986). Aplicación de la microscopía óptica y electrónica al estudio mineralógico y textural del clínker de cemento Portland. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo. 213 p.

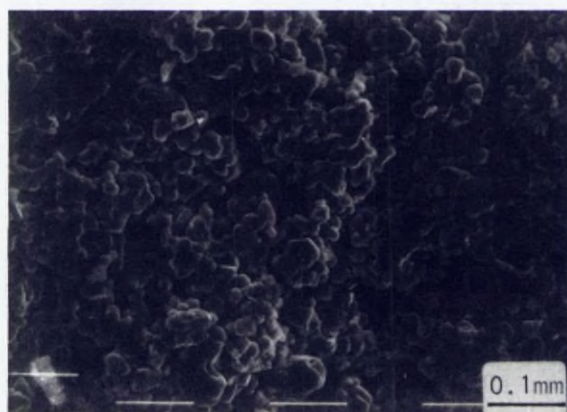


Fig. 1

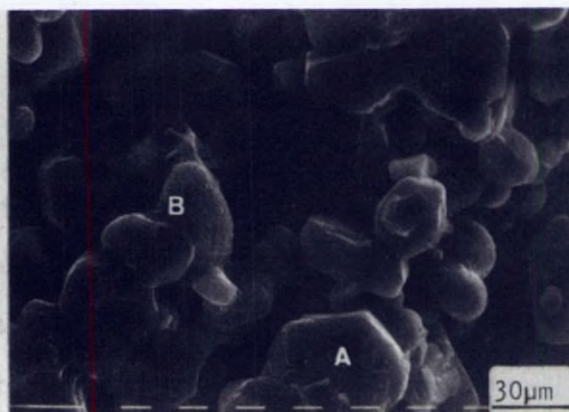


Fig. 2

ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION DE ESTRUCTURAS LOPOS PARA TECNOLOGIA CMOS SUBMICRA

Albert Romano-Rodríguez^{*,**}, Hans Norström^{*,***} y Jan Vanhellemont^{*}

^{*}Interuniversity Micro-Electronics Center (IMEC), Kapeldreef 75, B-3001 Leuven, Bélgica

^{**}Cátedra de Electrónica, Universidad de Barcelona, Diagonal 647, E-08028 Barcelona

^{***}Swedish Institute of Microelectronics, P.O. Box 1084, S-16421 Kista, Suecia

Introducción:

La técnica LOCOS¹ (LOCAl Oxidation of Silicon) ha sido la más utilizada durante las últimas dos décadas para realizar el aislamiento entre los dispositivos de los circuitos integrados de silicio, debido a su simplicidad. Una estructura LOCOS se compone de una capa delgada de óxido de silicio (el óxido de pedestal) crecida sobre el sustrato y, encima, una capa gruesa de nitruro de silicio (la máscara de oxidación). Mediante fotolitografía se abren unas ventanas y se oxidan térmicamente, formando el óxido de campo. Durante este proceso se produce oxidación lateral por debajo de la máscara, lo cual da lugar al pico de pájaro (bird's beak). Éste reduce el área de la oblea que puede ser utilizada para el procesado, cosa que es crítica en el desarrollo de circuitos integrados submicra. Por tanto es necesario reducir al máximo la longitud ocupada por el pico de pájaro a fin de aumentar la densidad de integración.

Material y Métodos:

En este trabajo se presenta un estudio mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) de la formación del pico de pájaro y de la nucleación de defectos en el sustrato para una tecnología LOPOS² (Local Oxidation of Polysilicon Over Silicon). Esta es una modificación muy prometedora de LOCOS consistente en la deposición de una capa de silicio policristalino o amorfo (en nuestro estudio) entre el óxido de pedestal y el nitruro. Se han fabricado estructuras de test LOPOS consistentes en líneas paralelas, de anchura y separación variable. Esto ha permitido estudiar la influencia de los diferentes parámetros tecnológicos (temperatura de oxidación, espesor de las diferentes capas, del óxido de campo, etc.). Las muestras para su observación en el microscopio han sido preparadas tanto en sección transversal (cross-section) como en sección planar (plan view) utilizando la técnica habitual de nuestro laboratorio³.

Resultados y Discusión:

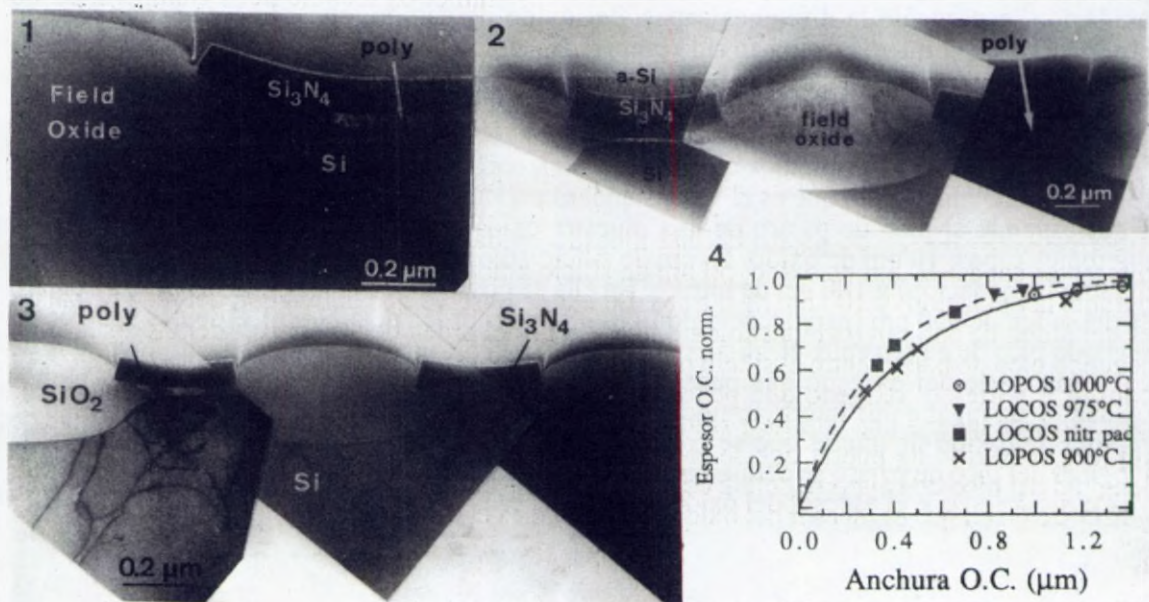
La mayor parte de los resultados que se presentan corresponden a muestras con un óxido de campo de 600 nm, puesto que es el valor standard para tecnología CMOS de 0,7 μm . La figura 1 corresponde al pico de pájaro de una muestra oxidada a 950°C, siendo el espesor de las diferentes capas: 10 nm de óxido, 50 nm de silicio amorfo (que se convertirá en policristalino durante la oxidación) y 100 nm de nitruro. En ella se observa que la longitud del pico de pájaro es del orden de 350 nm (para tecnología LOCOS es del orden de 500 nm). Además aparece un segundo pico de pájaro entre el silicio policristalino y el nitruro, que tiene el efecto favorable de consumir parte del oxígeno que penetra por debajo de la máscara. Así el silicio es menos oxidado y da lugar a una interficie silicio-óxido de pedestal más plana y, por tanto, el riesgo de ruptura del óxido de puerta que se crezca a continuación es menor. Hay que indicar que la longitud del pico de pájaro se define como la distancia entre el extremo de la máscara de nitruro y la posición en que el espesor del óxido de pedestal es el original.

La reducción del pico de pájaro conlleva un aumento notable de las tensiones en el sustrato y en las diferentes capas de la máscara de oxidación. Si dichas tensiones son demasiado elevadas, el sistema tenderá a relajarlas, pudiendo hacerlo en el sustrato o en la máscara. La figura 2 corresponde a una muestra oxidada a 1000°C y en ella se observan dos de los mecanismos de relajación: 1) rotura del óxido de pedestal (a la izquierda) y 2) rotura de la capa de nitruro y separación de la capa de silicio policristalino (a la derecha). La muestra de la figura 3 ha sido oxidada a 1050°C y en ella se observa que el sustrato de silicio ha sido que el ha absorbido las tensiones mediante la creación de defectos cristalinos (dislocaciones, defectos de empilamiento superficiales). En esta figura se aprecia también que la forma del pico de pájaro ha cambiado substancialmente respecto a la figura 2, debido a que ha habido, además, una deformación plástica del silicio. En ciertas muestras se observa que la creación de defectos y la rotura del óxido de pedestal coexisten y que en las zonas donde se produce la rotura se inhibe substancialmente la creación de defectos o son totalmente inexistentes.

Cuando las ventanas donde se produce la oxidación de campo se van reduciendo de tamaño, el suministro de oxígeno es menor y suele dar lugar a un adelgazamiento del óxido de campo. Esto implica que el aislamiento es "peor" y que las corrientes parásitas aumentan. La figura 4 muestra este efecto para diferentes combinaciones de espesores de la máscara y están comparados con el que se produce para una tecnología LOCOS convencional. Se aprecia que el adelgazamiento es mayor para la tecnología LOPOS.

Bibliografía

- ¹J.A. Appels, E. Kooi, M.M. Paffen, J.J.H. Schatorje y W.H.G.G. Verkuylen, Philips Res. Repts. **25**, 118 (1970).
- ²M. Ghezzi, E. Kaminsky, Y. Nissan-Cohen, P. Frank y R. Saia, J. Electrochem. Soc. **136**, 1992 (1989).
- ³A. Romano, J. Vanhellemont, H. Bender y J.R. Morante, Ultramicroscopy **31**, 183 (1989).



TÉCNICAS DE PREPARACION DE MUESTRAS DE MATERIALES SEMICONDUCTORES PARA SU OBSERVACION EN EL MICROSCOPIO ELECTRONICO DE TRANSMISION

Bertrando Romano-Rodríguez^{*,**}, Jan Vanhellemont^{*}, Hugo Bender^{*} y Juan-Ramón Morante^{**}

^{*}Interuniversity Micro-Electronics Cénter (IMEC), Kapeldreef 75, B-3001 Leuven, Bélgica
^{**}Cátedra de Electrónica, Universidad de Barcelona, Diagonal 647, E-08028 Barcelona

Introducción:

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) es una técnica de caracterización estructural con una gran resolución espacial. Con la reducción del tamaño de los dispositivos semiconductores se hace imprescindible su utilización para el estudio de aspectos estructurales. Cada vez más el uso de la microscopía electrónica de alta resolución (HREM) se está convirtiendo en una técnica indispensable para el desarrollo de procesos microelectrónicos. La preparación de las muestras para su observación en el microscopio es uno de los pasos clave. Si se utiliza un área de oblea relativamente grande para realizar un determinado proceso tecnológico, se utilizará la técnica de preparación standard, pero en determinados casos es necesario estudiar dispositivos predeterminados, lo cual obliga a utilizar un método de preparación más sofisticado. En este trabajo se presentan las técnicas de preparación desarrolladas en nuestro laboratorio^{1,2}.

Materiales y Métodos:

Para el estudio de materiales y dispositivos microelectrónicos hay dos aspectos que interesan: 1) la distribución sobre toda la oblea o sobre un determinado área de ella donde se ha realizado un determinado proceso tecnológico; p. ej., estudiar la densidad de defectos después de realizar la implantación [la técnica de preparación empleada es la sección planar (plan view)]; y 2) estudio de la geometría de las estructuras o distribución en profundidad; utilizando el mismo ejemplo, de los defectos de la implantación [sección transversal (cross-section)]. Los aparatos necesarios para estas preparaciones son disponibles en casi todos los laboratorios que trabajan en el campo de TEM aplicado a materiales de estado sólido: cortador por ultrasonidos, sierra de diamante, pulidora plana, pulidora cóncava, ion milling y técnicas químicas de elgazamiento.

Resultados y Discusión:

El método de preparación de cross-sections está esquematizado en la figura 1. Los diferentes pasos que hay que seguir son: a) cortar tiras de 2 mm de largo por 350 μm de ancho, utilizando la sierra de diamante. Se pegan dos de estas tiras con las caras activas una contra la otra. Esto protege las zonas de interés contra el deterioro durante el pulido mecánico y, al tener dos tiras y hacer un agujero en el centro, tendremos cuatro zonas que serán suficientemente delgadas para la observación; b) utilizando papeles abrasivos, se pule la muestra por las dos caras, hasta un espesor final de unas 60 μm ; c) utilizando la pulidora cóncava y pasta de diamante como abrasivo, se reduce el espesor del centro de la muestra a unas 20 μm . De esta manera será posible manipular la muestra con pinzas. d) se pega la muestra a una anilla de cobre de 2,3 ó 3 mm de diámetro y con una apertura rectangular de 1,5 mm por 1 mm. Se monta en el portamuestras del ion milling y se inicia el bombardeo utilizando argón y corrientes y tensiones moderadas, de forma que no se introduzca ningún tipo de daño en la muestra (0,5 mA y 6 kV por cañón). Utilizando una fotocélula y un láser de helio-neón es posible parar el ataque justo cuando se ha

producido un pequeño agujero en la muestra, cuyos bordes serán delgados y, por tanto, podrán ser observados en el microscopio electrónico. El tiempo de preparación suele ser de unas 3 a 4 horas. La figura 2 corresponde a una muestra preparada según este método.

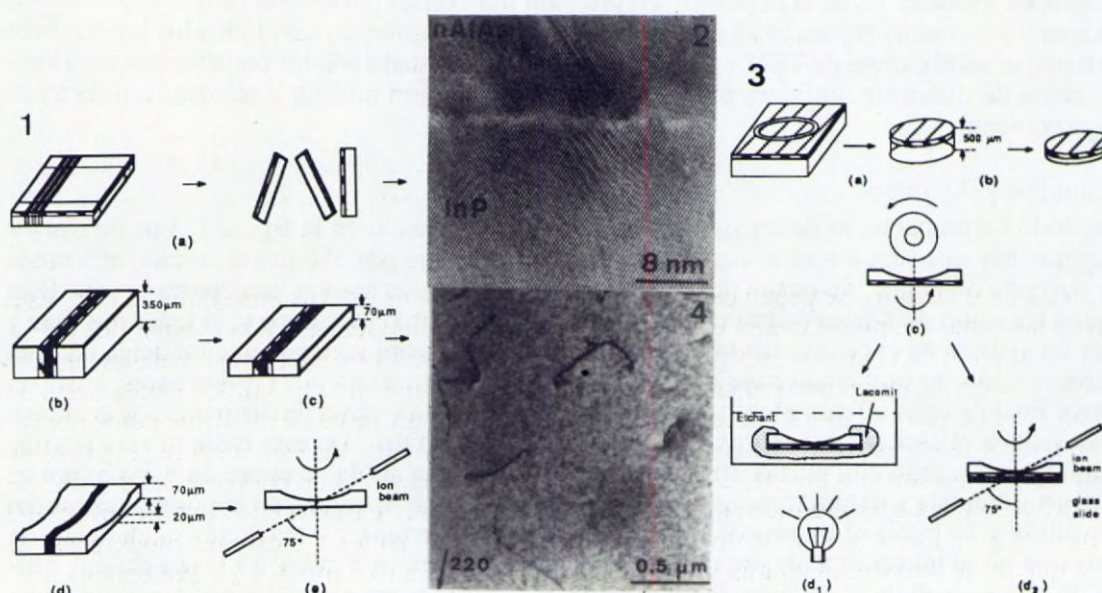
El otro método de preparación, plan view, está esquematizado en la figura 3. a) Utilizando un cortador de ultrasonidos, se corta un disco de 2,3 ó 3 mm de diámetro; b) utilizando papel abrasivo, se pule la parte posterior de la muestra hasta un espesor de unas 60 μm ; c) el pulido cóncavo se realiza hasta que el espesor central es de 20 μm ; el acabado final se realiza d₁) mediante un ataque químico por la parte posterior hasta que se forma un agujero, o d₂) utilizando el ion milling, bombardeando sólo por la parte posterior. El tiempo de preparación varía entre 1 y 3 horas, dependiendo del método de adelgazamiento final.

La figura 4 corresponde a los defectos que aparecen al crecer mediante MBE una capa de GaAs de 3 μm de espesor sobre un sustrato de silicio. Esta muestra ha sido preparada utilizando ion milling como paso final.

Estas dos técnicas han sido ampliadas a fin de poder preparar muestras de áreas predeterminadas de obleas o circuitos integrados. Para la cross-section se pegan una tira que contiene el área a estudiar y una tira de cristal del mismo espesor y tamaño. Esto permite controlar ópticamente la evolución de la preparación. Plan view utiliza el ion milling como método de adelgazamiento final. Controlando ópticamente la posición de la zona a estudiar respecto al agujero y utilizando un método de ion milling iterativo, es posible preparar muestras de zonas del orden de 10 μm de largo por 0.6 mm de ancho. En este caso los tiempos de preparación se alargan, siendo de unas 6 horas para la cross-section y de unas 4 para la plan view.

Bibliografía

- ¹A. Romano, J. Vanhellemont, H. Bender y J.R. Morante, *Ultramicroscopy* **31**, 183 (1989).
- ²A. Romano, J. Vanhellemont y H. Bender, *Proceedings del MRS* **199**, 167 (1990).



RESTAURACION DE IMAGENES DESENFOCADAS EN UN T.M.E. MEDIANTE PROYECCIONES SOBRE CONJUNTOS CONVEXOS Y CERRADOS.

J.R. SANJURJO, E.L. ZAPATA, J.L. CARRASCOSA Y J.M. CARAZO

BIOCOMPUTACION Y ANALISIS ESTRUCTURAL (CNB) Y FISICA DE PARTICULAS Y ELECTRONICA.

CENTRO NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA (CSIC) Y FACULTAD DE FISICA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Introducción: El T.M.E. proporciona imágenes (señales bidimensionales), f_{real} , que están relacionadas con la proyección (entendida como integral de línea o sumatorio) de la función de potencial electrónico tridimensional del espécimen sobre el plano de formación de la imagen, $f_{proyección}$. Dentro de una aproximación lineal podemos modelar esta relación como si el microscopio actuara como un filtro (conocido comúnmente como CTF), además de introducir un cierto ruido, n , que asumimos gaussiano y aditivo. El modelo de formación de imágenes que vamos a considerar es, pues: $F_{real} = F_{proyección} \times CTF + N$ (mayúsculas denotando funciones en el espacio de Fourier) (1,2).

Material y Métodos: El objeto del presente trabajo consiste en estudiar la posible "recuperación" de estas degradaciones instrumentales mediante métodos de restauración de imágenes basados en la teoría de operadores proyectores sobre conjuntos convexos y cerrados (3,4,5).

Para ello hemos creado una imagen formada por doce cuñas circulares blancas, valor 1.0, sobre un fondo negro, valor 0.0 (figura 1), a la que hemos aplicado el filtro CTF mediante una simulación por ordenador, además de sumarle ruido. El tamaño de la imagen fue de 128 x 128 píxeles.

Hemos comprobado experimentalmente que podemos recuperar la información perdida en los ceros de CTF, así como disminuir significativamente el ruido, aplicando subenfocos entre 1500 y 8000 Å y ruido con una desviación estándar entre 0.05 y 0.2. En concreto, la restauración obtenida en el caso sin ruido es perfecta, siendo las imágenes resultantes en los casos con ruido muy buenas, aumentando la degradación a medida que el ruido es mayor, como es lógico.

Un ejemplo de los resultados se puede observar en la figura 2. Corresponde al caso de desenfoque de 7500 Å, para el cual la función CTF posee dos ceros en la zona espectral considerada, con diversos niveles de ruido, desde la imagen sin ruido hasta $\sigma_n = 0.2$, pasando por 0.05 y 0.1 (de izquierda a derecha).

Por otro lado también hemos estudiado el comportamiento del método empleado frente a posibles errores experimentales de los parámetros instrumentales, como el caso del subenfoco, siendo también muy buenas las restauraciones.

La recuperación es posible puesto que incorporamos a la imagen experimental información sobre el objeto que no está en los datos medidos, pero que es globalmente conocida, tal como la extensión del especimen, límites máximo y mínimo de los valores de los píxeles y límite máximo de la norma de la imagen, así como información sobre diversas características estadísticas del ruido existente.

Los resultados obtenidos son prometedores y pueden ser muy importantes en diversas aplicaciones de microscopía electrónica, especialmente en alta resolución, e incluso que disminuyen las degradaciones introducidas en el proceso formador de imágenes.

Este trabajo ha sido financiado en parte por los proyectos TIC 88-0094, MIC 88-0549, PB 87-0365 y XUGA 80406488, y la fundación Ramón Areces.

Bibliografía: (1) H.P. Erickson y A. Klug. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond.* B.261, pp. 105-118. 1971

(2) W.O. Saxton. *Computer Techniques for Image Processing in Electron Microscopy*. Academic Press 1978.

(3) J.M. Carazo y J.L. Carrascosa. *Journal of Microscopy*, vol. 145, Pt 1, pp. 23-43. Enero 1987.

(4) J.M. Carazo y J.L. Carrascosa. *Journal of Microscopy*, vol. 145, Pt 2, pp.159-177. Febrero 1987.

(5) J.M. Carazo. *ICASSP'88*, New York, vol. 11, pp. 886-889.



Fig.1: Imagen patrón.

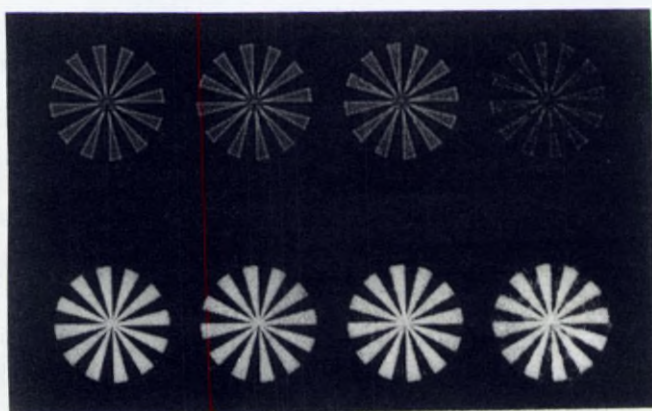


Fig. 2: En la primera fila tenemos las imágenes degradadas y en la segunda las restauraciones correspondientes.

STUDY OF SILVER-BEARING FILLER METAL DIFFUSION IN COPPER METAL BASE BY SEM AND EDXA, IN THE BRAZING.

A. Traveria¹, J.M. Tura², X. Camps³, M.D. de Castellar² and J. Sauló⁴

¹Inst.Jaume Almera, CSIC, Barcelona. ²Lab.Tèc.Fís. Anàl., ITQT, CSIC, Barcelona. ³Metaport, S.A. 08552-Taradell. ⁴Institut d'Estudis Catalans. Barcelona.

Introduction. The brazing is a joint process between two or more metallic parts, by using a nonferrous filler metal, which is called brazing metal, having a melting point above 450 °C, but below that of the Base Metal and its liquidus melting point must be below of the solidus temperature.

The filler metal is distributed between the closely fitted surface of the joint by wettability and capillarity attraction.

Material and methods. In the present work the filler metal (FM) was IN 8513: L-Ag30Cd and the base metal (BM) was electrolytic Cu (Fig. 1). In the rod of the filler metal the following phases were identified: α Zn(Cu), ordered β' (CuZn) and brittle β (Cu₂Cd). The larger part of the matrix was composed by β Cd(Ag). In this research two brazed structures were studied, obtained in the same experimental conditions, with the single exception of the post-brazing cooling cycle. Probe I suffered a slow solidification process at room temperature. Probe II was rapidly cooled by immersion in cold water.

Results and discussion. Probe I. In order to estimate the thickness of the diffusion zone in the braze-metal interfaces the specimen was arranged with its joint clearance not completely refilled and it may be observed one clear gap between the affected zone and the unaltered base metal appears. The initial joint clearance of both Cu pieces was 140 μ m. It may also be observed that the filler metal liquidus has induced during his penetration the kinetic-chemical erosion of the Cu base metal of about 45 μ m in both interfaces.

The mapping of Zn is shown in Figure 2 in which the high concentration of the element in the borders between FM and BM suggest a priori that this is the element which presents a more intense diffusion towards the BM. The metallic diffusion through the FM-BM interface was studied by one perpendicular point analysis,

as shown in Figure 3. It may be observed that Zn is the element with the deepest diffusion towards BM, whereas the remaining elements of FM show one diffusion more reduced (about 2% for Ag and 0.15% for Cd).

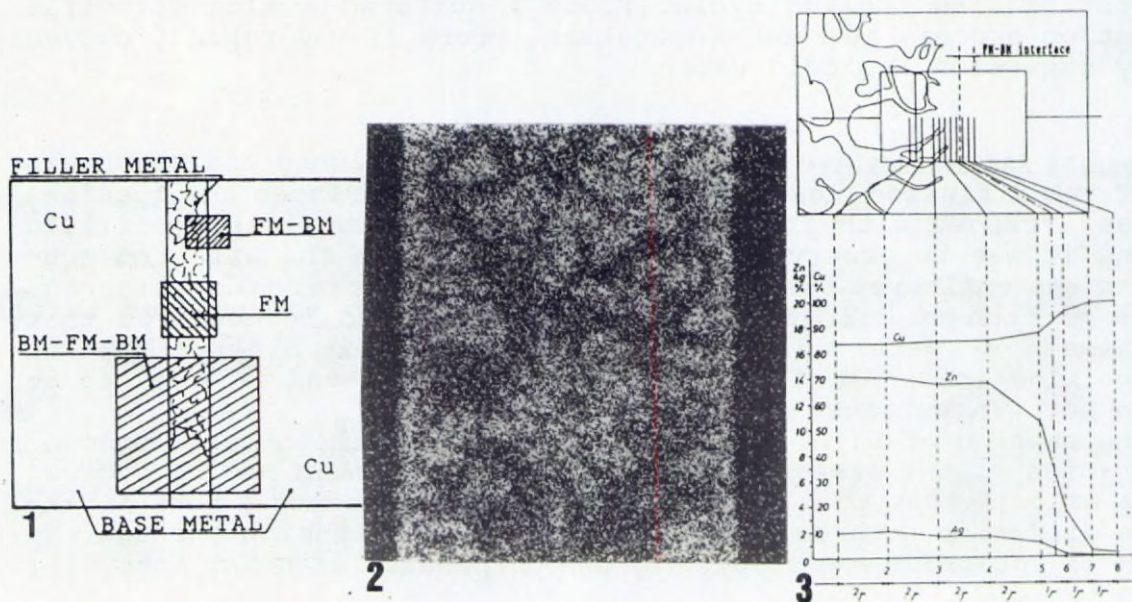
Probe II. It may be observed that the Zn diffusion towards the BM is less intense in probe II because of its higher cooling velocity. This means that such Zn diffusion is produced in solid state. As a consequence it is necessary to use a slow cooling rate to obtain a good brazing.

It has been proved that the Zn diffusion mechanism improves the erosion in the borders of the Cu grains. It may be concluded that Zn is the penetration agent towards the brazing zone of influence and in that way this element assures the reliability and goodness of the brazed joint, not only mechanically, but also in relation to other physical properties, such as electrical and thermal conductivity.

Fig.1. Diagram of one braze cross-section.

Fig.2. Zn mapping where it may be observed the high concentration of the element in the borders.

Fig. 3. Probe I. Cu, Zn, and Ag (%) diffusion on a perpendicular line to the interface (FM-BM).



AEROSOL CONTAMINATION OF GLASS INSULATORS IN HIGH TENSION NETWORK LINES

A.Traveria¹, J.M.Tura², M.D.de Castellar², C.Xaus³, R. Coy³, J.F.Garcia³ y A.Montero³.

¹Inst.Jaume Almera, CSIC, Martí i Franquès, s/n. 08028-Barcelona. ²Lab.Tèc.Fís.Anàl., ITQT, CSIC. Barcelona. ³Institut d'Estudis Catalans. Barcelona.

Introduction. Glass insulators coming from the surroundings of a big town and located in different high tension network lines were studied. It has been verified the degradation by environmental etching of the metallic junctions between the glass pieces. On the other hand it has been studied the composition of the airborne products settled on the mentioned insulators. The conductivity of the surface glasses is increased by the ensemble of such products specially in moist conditions. In such circumstances the discharge of the lines is produced with important economical losses.

Material and methods. The following three zones were analyzed: the upper and lower insulator glass surfaces and the surface of the top metallic piece (Zn galvanized iron). The elemental composition of the samples was studied by x-ray photoelectron spectroscopy (XPS/ESCA) until a depth about 10 nm and by scanning electron microscopy and energy dispersive x-ray analysis (SEM/EDX) until a depth of some micrometers. The structure of the crystalline substances present in the specimens was established by x-ray diffraction (XRD).

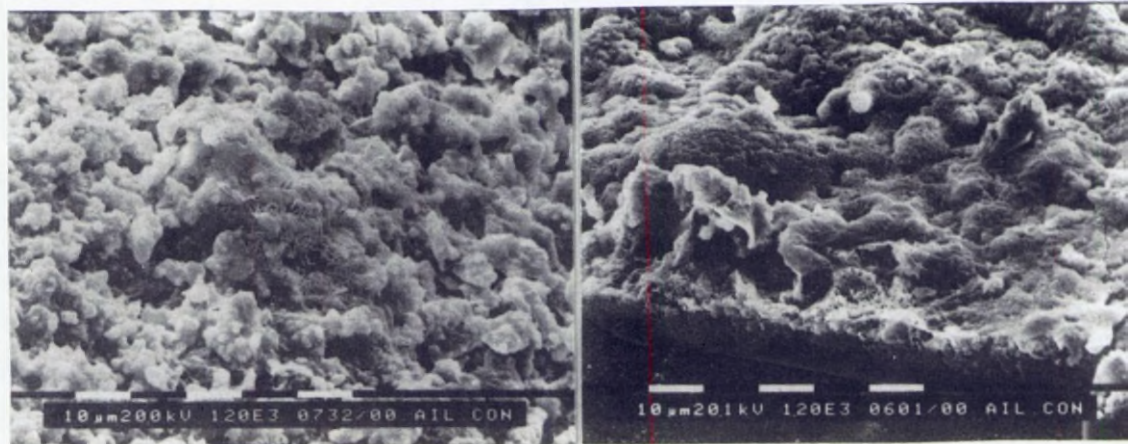
Results and discussion. XPS/ESCA. The presence of SO_4^- and Zn^{++} ions has been detected by XPS/ESCA in the top metallic pieces as well as in the upper and lower glass surfaces. It was observed that the quantity of Zn^{++} decreased in the lower part of the glass, contrary what happens at upper part of the glass. The top metallic piece showed the largest Zn^{++} content. The photoelectronic peaks S 2p and Ca $2p_{3/2,1/2}$ detected in the upper glass surface can be confidently assigned to airborne calcium sulphate. XRD. From the study of the samples corresponding to the deposition on the glass, the following phases have been identified by XRD: gypsum, calcite, α -quartz and dolomite. The presence of such materials is probably due to dust contamination from the geological surroundings with exception of sulphates. In fact, gypsum might be originated from the reaction $\text{SO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{CaCO}_3 = \text{CaSO}_4$. The XRD dia-

grams from the surfaces of the metallic pieces allowed to identify the following phases: Zn^0 , ZnO and complex hydrated sulphates. SEM/EDX. The glass insulators were broken and some fragments were studied with these techniques. Three types of morphology may be observed in Fig.1: a) granulated particles, b) particles with soldering necks, c) acicular powder particles. No different EDX response was detected among these morphologies. Rather continuous agglomerates may be seen in Fig.2. This suggests that the material has been formed in more wet conditions than in Fig.1. It may be inferred from the foregoing analytical results that the metallic pieces have suffered a corrosion, probably induced by SO_2 and moisture. In these conditions a migration of zinc and iron traces towards the surfaces of the glass insulators occur probably. This fact may originate a mixture of conductive salts in wet conditions which can produce the discharge of the lines. From the results obtained in the present work it could be recommended a new coating on the galvanized metallic surfaces, e.g. a ceramic one. However, the negative factor, the atmospheric contamination, is more difficult to annihilate.

Bibliography

-P.A.Russel. "The analysis of atmospheric particulates by electron microscopy". Proc.XIIth Internat.Congress Electron Microsc. Seattle 1990, Vol.2, 547.

-J.T.Armstrong and P.R.Buseck. "Applications in air pollution research of quant. analysis of individual microparticles with electron beam instruments". Electron microscopy and x-ray applications to environmental and health analysis, vol.1, P.A. Russel and A.E.Hutchings, eds. Ann Arbor Sciences Publ., Michigan 1978



IDENTIFICACION DE DEFECTOS DEL ALGODON ("HONEY DEW") POR SEM, IR Y CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

J.M.Tura¹, M.D. de Castellar¹, A.M.Manich¹, A.Traveria², M. Font-Altaba³, J.Pujadas¹, F.Marsal⁴ y J.Isart⁵.

¹Lab.Tèc.Fís.Anàl.,ITQT, CSIC. Jordi Girona, 18. 08034-Barcelona. ²Inst.Jaume Almera, CSIC. Barcelona.

³Univ.Barcelona-IEC. ⁴Univ.Politèc.Catalunya, Terrassa. ⁵CID, CSIC, Barcelona.

Introducción. En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en un intento de eliminar el efecto "honey dew" o recubrimiento biogénico de ciertos algodones. Este recubrimiento tiene su origen en la deposición superficial de sustancias azucaradas producidas por las secreciones de la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) o del pulgón (*Aphis gossypii*). Dichas sustancias originan alteraciones en la estructura y morfología superficial causando grandes problemas en las etapas de procesamiento de la misma para ser hilada (1,2).

Material y métodos. En el anclado del "honey dew" ocurren perturbaciones en la masa del polímero con lo que ciertos grupos funcionales en equilibrio estable adquieren movilidad migrando a la superficie polimérica. Dichos grupos son en parte los responsables de los fenómenos de adherencia físico-química entre las fibras y el "honey dew". Para vencer esta adherencia se micro-pulverizó el algodón con un surfactante no iónico derivado del polioxietileno.

Mediante SEM, espectroscopía de infrarrojos y cromatografía en capa fina se estudiaron los resultados obtenidos en diversas etapas de hilatura.

Resultados y discusión. El material utilizado en este estudio fue algodón americano con "honey-dew", de $l_e=28$ mm y finura "micronaire" $=3.9$. El pulverizado con el producto surfactante se realizó en la desmotadora, etapa previa al batanado y cardado. El efecto del producto surfactante incorporado a la fibra de algodón con "honey-dew" se analizó mediante la técnica física de análisis SEM (microscopía electrónica de barrido) con un aparato Philips 515 (Figs.1 y 2).

Las zonas más brillantes de la Fig. 1 indican acúmulos de fibras originados por efecto del pulverizado. En la Fig.2 se puede apreciar con detalle el producto surfactante (A) en contacto con la fibra de algodón (B).

Con la ayuda de las técnicas de cromatografía en capa fina y espectrografía de infrarrojos aplicadas al producto surfactante

y al propio algodón con este producto, se llegó a las siguientes conclusiones:

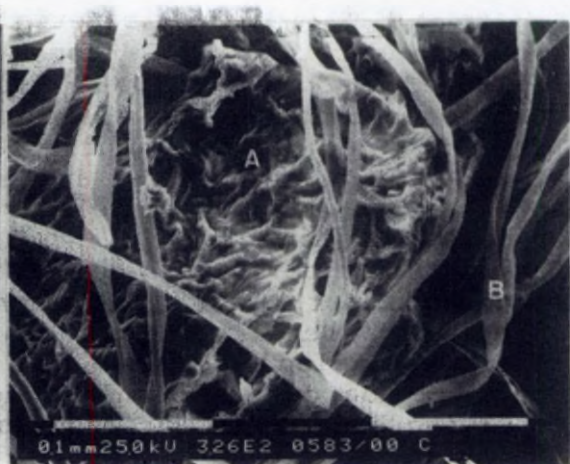
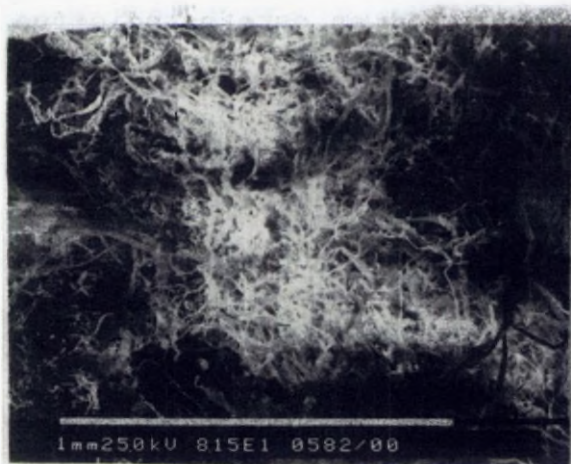
- que la incorporación del surfactante ocasiona ciertas mejoras en el cardado del algodón con "honey-dew", debido posiblemente a que el surfactante ejerce una acción de arrastre de cierto porcentaje de recubrimiento biogénico.
- que el surfactante del algodón va desapareciendo a lo largo de las distintas etapas de hilatura.
- que en la máquina de hilar los problemas continuaron siendo similares a los que se planteaban cuando el algodón no tenía el producto incorporado.

No obstante, se pudo observar en el hilado la persistencia residual de azúcares propios del recubrimiento "honey-dew".

Bibliografía

1. Development of methods to measure cotton stickness. Alii, A.N. and Khalifa. Cot.Fibres.Trop., 35:411-13 (1980).
2. International Committee on Cotton Testing Methods. Bremen 1986. A.Schenek, ITMF.

Este trabajo forma parte del proyecto PGC-PB87-0409 "Caracterización de las Interfases y Fenómenos de Adhesión en Materiales Poliméricos de Origen Vegetal y Recubrimiento Biogénico", financiado por la PGC y el CSIC.



Estudio de dominios magnéticos en cintas amorfas de $\text{Fe}_{78}\text{B}_{13}\text{Si}_9$ por
Microscopía electroacústica de barrido
M. Urchulategui, J. Piqueras, C. Aroca

Física de Materiales

Facultad de Ciencias Físicas
Universidad Complutense. 28040 Madrid.

Introducción:

El estudio de materiales magnéticos amorfos se ha incrementado en los últimos años debido a sus interesantes propiedades magnéticas desde un punto de vista práctico, tales como bajo campo coercitivo, gran permeabilidad, bajas pérdidas magnéticas, etc. Este trabajo muestra un estudio de la estructura de dominios magnéticos de cintas amorfas realizado mediante microscopía electroacústica de barrido, técnica que no había sido aplicada con anterioridad al estudio de amorfos magnéticos.

Material y Métodos:

La composición de las cintas ferromagnéticas amorfas estudiadas (2605-52 de Allied Chemical Co) es $\text{Fe}_{78}\text{B}_{13}\text{Si}_9$. Las observaciones de microscopía electrónica se han realizado en un microscopio electrónico de Barrido Cambridge S4-10 a frecuencia entre 40 y 240 kHz con una tensión aceleradora de 10 keV. Para comparar con las imágenes electroacústicas se han realizado observaciones usando la técnica Bitter en las mismas muestras.

Resultados y Discusión:

La técnica Bitter muestra la existencia de una estructura magnética en la que hay regiones con dirección de anisotropía en el plano de la cinta y regiones con anisotropía perpendicular. Esta estructura es consecuencia de inhomogeneidades microestructurales producidas al enfriar rápidamente durante el proceso de preparación (1). La comparación entre las imágenes Bitter y electroacústicas permite identificar claramente en estas últimas, las regiones con anisotropía normal a la superficie. La figura muestra la imagen MEAB de los dominios magnéticos en esta región. El contraste surge principalmente en las paredes de los dominios debido al campo de tensiones asociado a las mismas. En las micrografías MEAB se observa un contraste en las paredes con una anchura de unas 10-20 μm .

Las imágenes MEAB se han obtenido en el modo lineal aunque existe una componente no lineal de intensidad demasiado baja para dar lugar a imágenes. La existencia de términos no lineales indica la posibilidad de que la señal acústica se genere por un mecanismo de acoplamiento magnético basado en el fenómeno de la magnetostricción.

En nuestras observaciones de muestras magnéticas amorfas con baja magnetostricción no hemos podido observar la estructura magnética, lo que apoya la mencionada posibilidad. Estos resultados muestran que con el MEAB se pueden observar fácilmente estructuras magnéticas en materiales amorfos mientras que utilizando técnicas convencionales de microscopía de barrido se necesita utilizar tensiones de 200 keV (2).

Bibliografía:

- 1) C. Aroca, P.S. Sánchez y E. López, IEEE Trans. Magn. MAG-17, 1462 (1981)
- 2) J.D. Livingston y W.G. Morris. IEEE Trans. Magn. MAG-17 1624 (1981)

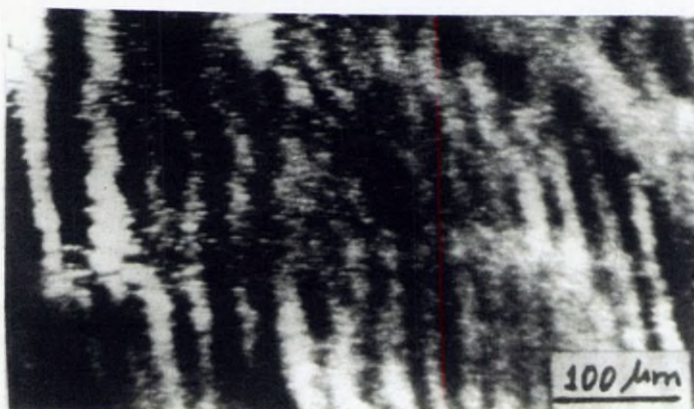


Imagen electroacústica de paredes de dominios magnéticos a 234 kHz.

Titulo: Estudio de depósitos de contaminantes ambientales en superficies de rocas monumentales mediante S.E.M. y E.D.A.X.

Autores: M. Vázquez, R.M. Esbert, F.J. Alonso.

Centro: Dpto. Geología, Univ. Oviedo.

Introducción: Los contaminantes atmosféricos, en colaboración la humedad ambiental, juegan un importante papel en los procesos de alteración de las piedras utilizadas en los monumentos. En concreto, las partículas sólidas se depositan sobre la superficie de las rocas, siendo, en el caso concreto de Avilés, el origen de su progresivo ennegrecimiento.

Paralelamente, contaminantes gaseosos como el SO_2 acaban reaccionando con la roca, generando productos de alteración: yeso y otras sales solubles, que constituyen una de las causas principales del deterioro de las rocas en los edificios.

Material y Métodos: Las rocas soporte de la contaminación son de naturaleza carbonatada: dolomías terciarias de grano fino [1]. El análisis de los productos de alteración se ha realizado por distintos métodos; en particular, se ha observado su morfología mediante S.E.M., con el apoyo de técnicas analíticas como la espectrometría de rayos X por energía dispersiva (E.D.A.X.) [2].

Los ejemplos de esta comunicación están tomados de las piedras de la portada de la Capilla de los Angeles, de la Iglesia de los Franciscanos de Avilés (Asturias), ciudad industrial con elevada contaminación [3].

Resultados y Discusión: Las costras observadas presentan un espesor variable así como arenitización entre ellas y el soporte rocoso, desprendiéndose de éste con facilidad, y contribuyendo al deterioro progresivo del sustrato. Son de color grisáceo estando mucho más ennegrecidas en la parte externa que en la interna.

De acuerdo con los análisis de difracción de rayos X la roca soporte esta constituida por dolomita y calcita, con un 68 % y un 31 % respectivamente (Fig. 1), mientras que las costras muestran un enriquecimiento en yeso (alrededor del 5 %), que tiende a concentrarse en superficie (Fig. 2).

También son abundantes en la superficie de las costras los microfilamentos vegetales (Fig. 3), que con el tiempo contribuyen a aumentar el deterioro, bien sea desde el punto de vista físico, por las microfisuras inducidas por su crecimiento hacia el interior de la piedra, o desde el punto de vista químico, por la retención de la humedad y consiguiente disolución del material carbonatado

En las zonas más deprimidas se observan abundantes esférulas (Fig. 4), a veces con formas verrugosas. Los análisis mediante E.D.A.X. han detectado los siguientes cationes: Mg^{2+} , Al^{3+} , Si^{2+} , K^{+} , Ca^{2+} y Fe^{2+} . Dichos datos permite relacionar dichas esférulas con la contaminación ambiental, atribuyéndolas, en parte, a cenizas volantes provenientes de las industrias de Aviles.

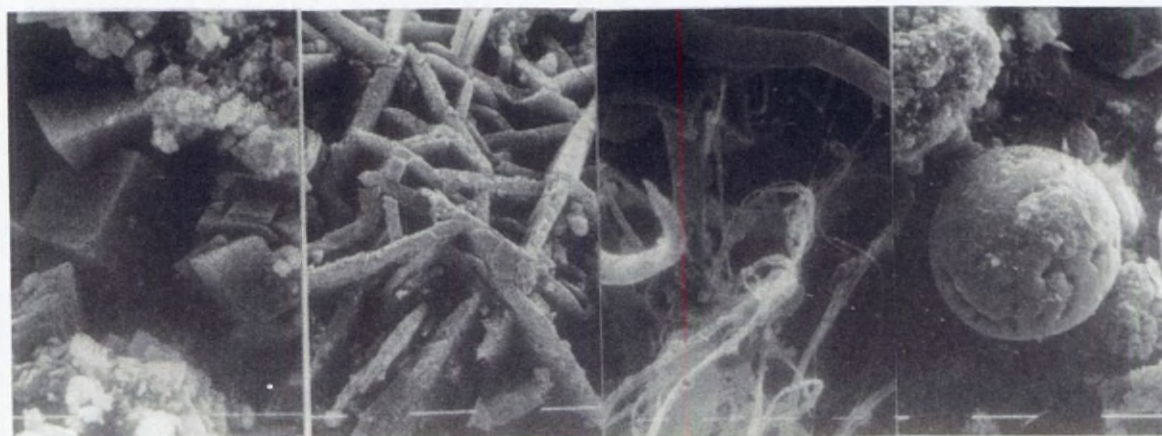
Bibliografía: [1] M. Vázquez Llorens (1986). "Estudio alterológico de las piedras utilizadas en algunos monumentos de Avilés". Tesis de Licenciatura, Dpto. Geología, Univ. Oviedo, 110 pag.
[2] R. M. Esbert, M. Vázquez y F.J. Alonso (1988). "Petrografía, formas y procesos de alteración desarrollados en las piedras de algunos monumentos de Avilés (Asturias)". Bol. Geológico y Minero, 99, p:432-443.
[3] A. Suárez Marcos (1985). "La contaminación atmosférica en Avilés". Bol. Información Ambiental, Aytmo. Avilés, p:17-62.

Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

Fig. 4



Cambios en la microestructura de los suelos producidos como consecuencia de la extracción de metales unidos por radicales orgánicos y materia orgánica.

J. Wierzechos, C. Ascaso y M.T. García Gonzalez
Geoquímica y Mineralogía

Centro de Ciencias Medioambientales

Introducción: Existe información suficiente que indica que un prerequisite para la formación de la estructura de los agregados es la floculación de las partículas de arcilla. Los macro agregados consisten en complejos de arcilla-metal polivalente-materia orgánica (C-P-MO) donde la arcilla y la materia orgánica humificada pueden estar unidos por cationes polivalentes como: Fe, Al, Ca o Mg (1). En este trabajo se ha llevado a cabo un estudio sobre la influencia que tiene el extraer selectivamente de los suelos policationes de Fe, Al y materia orgánica, para así conocer el efecto de dichos compuestos en los procesos de agregación es decir sobre la microestructura.

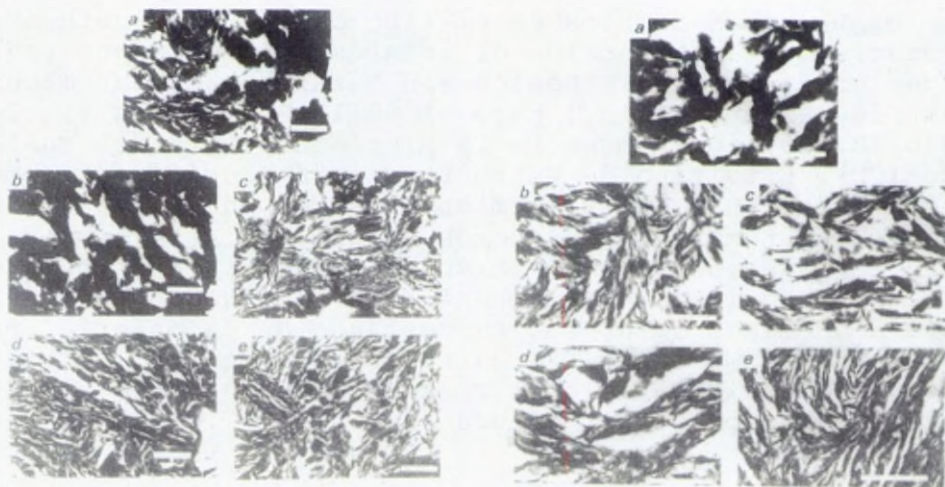
Material y Métodos: Las muestras de suelo fueron obtenidas de un suelo paleundalf (USDA) (símbolo RC) y de un suelo orthic luvisols (FAD) (símbolo SB). Las muestras de suelo han sido tratadas con acetilacetona en benceno para disolver el hierro y aluminio amorfos orgánicos (AAB), acetilacetona en medio acuoso para disolver hierro y aluminio amorfos orgánicos y parte de materia orgánica (AAA) (2) peróxido de hidrógeno para destruir materia orgánica (PH) y con acetilacetona en medio acuoso para disolver hierro y aluminio orgánicos amorfos en muestras en las que previamente se ha destruido la materia orgánica (PHAAA).

Resultados y Discusión: Los cambios en el tipo de microestructura como consecuencia de la extracción de metales enlazados por radicales orgánicos a materia orgánica son mostrados en las microfotografías de MET en la fig.1 para el suelo RC y en la fig.2 para el suelo SB. La fig.1a muestra la microestructura del suelo no tratado (CN). Este tipo de estructura está clasificada como "Pusch" o floculenta. El tratamiento AAB conduce a un decremento visible del tamaño de los poros (fig. 1b). Este tipo de estructura se relaciona con la notable estructura abierta o de panal. Después del tratamiento AAA (fig. 1c) se observa una estructura de dominio discreta. La destrucción de materia orgánica (PH) causa formación de la estructura de dominio turbostrática (fig. 1d). El tratamiento PHAAA no conduce a cambios tan expresivos del tipo de estructura (fig. 1e).

Cierta influencia de los metales enlazados por radicales orgánicos en la agregación es perceptible a consecuencia de la liberación de policationes de los complejos y del tipo C-P-MO (fig.1b) pero el gran papel en la formación de agregados de estructura abierta para este tipo de suelo lo juega la materia orgánica. La fig.2a muestra la organización de las partículas de arcillas de una muestra no tratada de suelo SB. Este tipo de estructura se relaciona con la estructura de panal. El tratamiento AAB lleva a un claro decrecimiento del tamaño del poro (fig.2b). Esta microfotografía muestra una agrupación de dominios en forma de libro. El tratamiento AAA (fig.2c) no conduce a unos cambios tan visibles en el tipo de estructura arcillosa en relación con la situación precedente. Esto significa que la liberación adicional de materia orgánica no provoca defloculación profunda. La destrucción de materia orgánica (PH) es la causa de que localmente haya sido observada una estructura con dominio turbostrático pero generalmente podemos clasificar esta situación como una estructura floculenta (fot.2d). Después del tratamiento PHAAA (fig.2e) se observa una estructura dispersa que se clasifica como estructura turbostrática. Ello significa que parecen importantes las policationes en la estructura abierta de agregado

Bibliografía:

1. Edwards, A.P. y Bremner, J.M. 1987. Microagregates in soils J. Soil Sci., 34:105-112.
2. Giovannini, G. y Segui, P. 1976. Iron and aluminium as cementing substances of soil aggregates. J. Soil Sci., 27: 140-153.



ESTUDIO POR MICROSCOPIA ELECTRONICA DE GaAs DOPADO CON Sn MEDIANTE IRRADIACION CON LASER PULSANTE DE RUBI

A. Vilà, A. Herms, A. Cornet, J.R. Morante, B. García-Carretero,
J. Piqueras

Laboratori de Caracterització de Materials per la
Microelectrònica. Dep. Física Aplicada i Electrònic. Univ.
Barcelona. Diagonal, 645. Barcelona 08028.

Introducción:

Los tratamientos con laser pulsante, capaz de fundir la capa superficial y facilitar así la difusión de las impurezas hacia el interior del material, está confirmándose como una interesante y promotora alternativa para el dopaje de semiconductores (1). Sin embargo, durante el proceso de fusión y posterior recristalización que tiene lugar durante el dopaje se puede perturbar la cristalinidad del sustrato dando lugar a defectos que deterioran las características eléctricas del material.

Material y Métodos:

Este trabajo expone los resultados de un estudio por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y microanálisis por Microscopía de Transmisión y Barrido (STEM) de muestras tratadas con láser pulsante comparando los dos casos de presencia y ausencia de capa dopante superficial. El dopante utilizado en nuestro caso ha sido Sn, que es un dopante tipo n muy atractivo en el caso de GaAs por ser el elemento más ligero de los de la columna IV.

Resultados y Discusión:

En las imágenes obtenidas se observa el sustrato en perfectas condiciones de cristalinidad en la superficie de las muestras en que no se había depositado Sn (fig. 1). No se observan problemas en la recristalización sin capa de dopante (2). En cambio, en aquellas muestras con capa superficial de Sn sí se observan defectos cuya densidad varía según la cantidad de energía utilizada.

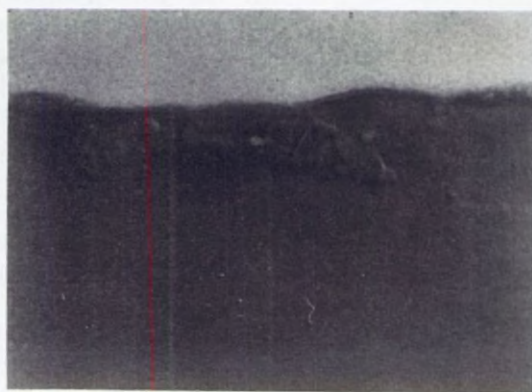
Si la energía es baja, $0,3 \text{ J/cm}^2$, aparece cerca de la superficie una zona con defectos más o menos del espesor de la capa fundida. Aparte de los precipitados de Sn los principales defectos hallados son twins y dislocaciones distribuidas en toda la profundidad de la zona hipotéticamente fundida.

Para las densidades de energía mayores (del orden de $0,5 \text{ J/cm}^2$),

la mencionada zona prácticamente desaparece, quedando sólo ligeros vestigios de ella muy localizados, que alcanzan un espesor de unos 1300 Å (fig. 2). En nuestro campo de observación sólo se han hallado 2 con estos aglomerados, la cual da una baja densidad de los mismos. La explicación de estas diferencias puede basarse en el hecho de la localización de la fusión que tiene lugar por el tratamiento y en su rapidez. Cuando el espesor de la capa fundida es pequeño, la concentración de impurezas alcanzable en el líquido es grande, superando el límite de solubilidad en el equilibrio. En la solidificación se forman precipitados de la impureza, los cuales actúan como núcleo de dislocaciones y defectos. Ello se observa en imágenes de alta resolución de la muestra tratada con una densidad de energía menor (fig. 1). En cambio, en la muestra irradiada con una mayor densidad de energía, la cristalinidad es mejor en toda la zona tratada, ya que al haberse fundido más volumen la concentración de impurezas alcanzada es mucho menor, no formando apenas precipitados que originen defectos. El análisis por microanálisis EDS (Energy Dispersive Spectrometry of X-ray) indica que los precipitados hallados son de estaño, no habiéndose hallado señales que sugieran la formación de óxidos de los componentes del semiconductor.

Bibliografía:

1. B.J. García, J. Martínez, J. Piqueras, J.L. Castaño, A. Muñoz-Yagüe.
Appl. Phys. A46, 191 (1988)
2. J.A. Golovchenko, T.N.C. Venkatesan.
Appl. Phys. Lett. 32, 147 (1978)



COMPOSITION PARTICLE-SIZE RELATIONSHIP IN ATMOSPHERIC AEROSOL SAMPLES

C.Xaus¹, J.M. Tura², A.Traveria³, E.Casassas¹ and F. García¹

¹Institut d'Estudis Catalans, Carme 47. 08001-Barcelona. ²Lab.Tèc.Fís.Anàl., ITQT, CSIC. Barcelona.

³Inst.Jaume Almera, CSIC. Barcelona.

Introduction. The aim of this work is the scanning electron microscopy with x-ray analysis (SEM-EDX) morphological and micro-analytical characterization of atmospheric aerosols in a heavy-traffic suburban area. Aerosols are sampled in a cascade impactor, during a full week. For each size-fraction a semiquantitative analysis of the more characteristic elements is performed. A synthetic atmospheric aerosol is used as reference material.

Material and methods. The collection point was placed in the Montcada relay area by the Barcelona-France motorway. Sampling was performed during a week, with daily periodicity. A Sierra-Misco high-volume sampler with a five-stage cascade impactor was used. The aerosol samples were collected in fractions according to the particle size on the different stages of the impactor and on a backup cellulose-ester absolute filter. At the flow rate used the cut-off values for the particle size collected in each stage was: 6.4, 3.1, 1.7, 0.8 and 0.39 μm . Sampling time was 24 h and the daily air volume aspired was 2.000 m^3 approximately.

Results and discussion. Figures 1 and 2 show the particles collected in first stage (over 6.4 μm) and fifth stage (between 0.39 and 0.8 μm) respectively. Elemental composition of the samples was studied by EDX; Al, Si, S, Cl, K, Ca and Fe were detected in all samples analyzed and Pb was only found in the fifth filter, which corresponds to the lowest particle size. Through the use of a synthetic reference sample of atmospheric aerosol (a solid mixture of SiO_2 , Al_2O_3 , FeCl_3 , PbCl_2 , CaO and K_2SO_4) used for calibrating the EDX signal, the semiquantitative analysis of all these elements was performed. Tridimensional diagrams were built in order to characterize the elemental concentration variation in every stage during the week studied.

A narrow relationship between particle size and chemical elemental composition has been found. The largest particles (over

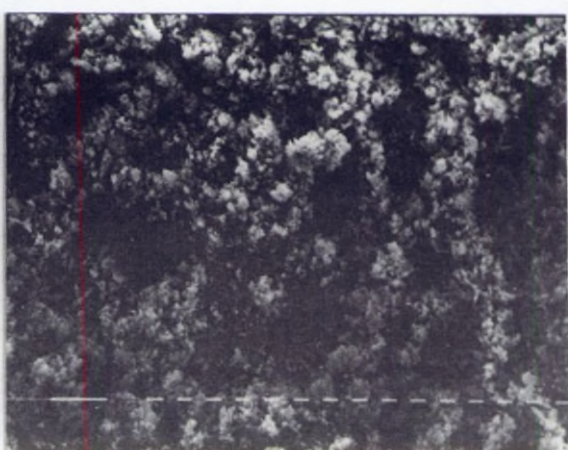
6,4 μm) show a large amount of Si, Ca and Al; this means a natural source. The smallest particles (between 0,39 and 0,8 μm) show a larger S concentration, which is a characteristic feature of an anthropogenic pollution. It must be remarked that Pb was only detected at particles of this last stage.

Moreover, a Pb concentration increase has been observed during the week-end, when a more intense activity in traffic occurs. A maximum was observed on Sunday, meanwhile the minimal values appeared on Tuesday and Wednesday, precisely during the lowest traffic density period.

This research is a part of a project which has been financed by CICYT of the Spanish Government and by the Institut d'Estudis Catalans in Barcelona.

Bibliography

- T.L. Chan, D.R. Lawson, Atmos. Environ., 15 (1981) 1273.
- E.S. Macias et al., Atmos. Environ., 15 (1981) 1971.
- G.P. Reischl, J. Aerosol Sci., 13 (1982) 216.
- J.A.C. Broekaert et al., Anal. Chem., 54 (1982) 2174.
- D. Lichtman and S. Mroczkowski, Environ. Sci. Technol. 19 (1985) 274.
- J.E. Post and P.R. Buseck, Environ. Sci. Technol. 19 (1985) 682.



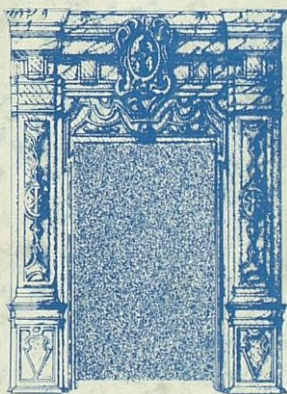
INDICE DE AUTORES

AUTORES	PAGINAS
ABAUURREA, M.A.	1
ADEVA, P.	187
AGUIRRE, A.	3
ALCHE, J.D.	5
ALMAGRO, J.F.	189
ALONSO, J.	7
ALVAREZ, M.P.	9
ALVAREZ, M.P.	11
APARICIO, J.F.	13
AVILES-TRIGUEROS, M.	15
BADIA, J.M.	191
BANDA, P.A.	193
BARBA, C.	195
BENITO, J.	17
BERNAL, S.	197
BOSCH, F.	199
BOTA, S.A.	201
CALAP, J.	19
CALVINO, J.J.	203
CALVINO, J.J.	205
CARRETERO, B.	21
CARRETERO, L.	23
CASARES, J.A.	25
CASTELLS, M.T.	27
CASTELLS, M.T.	29
CASTILLA, M.A.	31
CAVERO, J.M.	207
CERNUDA, R.	33
CORTADELLAS, N.	35
CRESPO, P.V.	37
CUADROS, M.A.	39
CUEVAS, L.	41
DE CASTELLAR, M.D.	209
DE CASTELLAR, M.D.	211

DEL BRIO, M.A.	43
DEL CACHO, E.	45-47
DEL CACHO, E.	49-51
DIEGO, J.A.	213
DIEGO, J.A.	215
DOMENECH, M.T.	217
DURFORT, M.	53
ESCOBAR, C.	55
FADON, B.	57
FERNANDEZ-SEGURA, E.	59
FERRER, C.	61
FONTARNAU, R.	219
FRANCO, A.	63
GALLEGO-HUIDOBRO, J.	65
GALLEGO-HUIDOBRO, J.	67
GARCIA, E.	221
GARCIA, A.	69
GARCIA, J.	223
GARCIA, M.P.	71
GARCIA, M.P.	73
GARCIA, S.	75
GIMENO, J.V.	225
GOMEZ-VILLAMANDOS, J.C.	77
GONZALEZ, R.	79
GONZALEZ, R.	81
GONZALEZ DE CANALES, M.L.	83
GONZALEZ-VALVERDE, P.	85
GOZALBO, A.	227
GUILEMANY, J.M.	229
GUILEMANY, J.M.	231
GUILEMANY, J.M.	233
GUILEMANY, J.M.	235
GUILEMANY, J.M.	237
GUILEMANY, J.M.	239
GUILEMANY, J.M.	241
GUILEMANY, J.M.	243
GUILLEN, C.	87

GUINEA, A.	89
GUTIERREZ, A.	91
HERNANDEZ, M.	245
HERRERA, M.I.	93
HIDALGO, S.	247
LEBRATO, J.	95
LOPEZ, A.	97
LOPEZ, A.	99
LOPEZ, C.M.	101
LORENZO, C.	103
LOZANO, M.T.	105
LUCAS, M.M.	107
MADRID, J.F.	109
MADRID, J.F.	111
MARCO, S.	113
MARSAL, M.	249
MARTIN-GONZALEZ, A.	115
MARTIN-GONZALEZ, A.	117
MARTINEZ, F.J.	119
MARTINEZ, G.	121
MARTINEZ-MENARGUEZ, J.A.	123
MARTINEZ-MENARGUEZ, J.A.	125
MENENDEZ, B.	251
MESEGUER, J.	129
MESEGUER, J.	131
MESEGUER, J.	133
MOLINA, S.I.	253
MONTERO, E.	255
MORENO, F.J.	135
NAVARRO, V.	137
NIETO, P.	139
NO, M.L.	257
OSTOS, M.V.	141
PARRAS, M.	259
PASTOR, L.M.	143
PEIRO, F.	261
PEIRO, F.	263

PEIRO, F.	265
PEREZ, A.	267
PEREZ, J.L.	269
PIZARRO, C.	145
POQUET, M.	147
POQUET, M.	149
PORTILLO, J.	271
RINCON, J.M.	273
RINCON, J.M.	275
RODRIGUEZ, A.	277
RODRIGUEZ, A.	279
ROMANO-RODRIGUEZ, A.	281
ROMANO-RODRIGUEZ, A.	283
ROMERO, L.	151
RUBIO, C.	153
RUIZ, J.	155
SANCHEZ, E.	157
SANCHEZ, E.	159
SANCHEZ, F.	161
SANJURJO, J.R.	285
TOLEDO, M.V.	163
TOLEDO, M.V.	165
TRAVERIA, A.	287
TRAVERIA, A.	289
TURA, J.M.	167
TURA, J.M.	291
URCHULUTEGUI, M.	293
VALLADARES, F.	169
VALPUESTA, J.M.	171
VAZQUEZ, M.	295
VILA, A.	297
VILLENA, M.I.	173
VISA, N.	175
WARLEY, A.	177-179-181-183
WIERZCHOS, J.	299
XAUS, C.	185
XAUS, C.	301



SERVICIO•DE•PUBLICACIONES

UNIVERSIDAD•DE•CADIZ

1992